

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Etude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'établissement de la sénescence prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez les fibroblastes humains IMR-90**

Piront, Neil

*Award date:*  
2006

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Etude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'établissement de la sénescence  
prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez les  
fibroblastes humains IMR-90**

PIRONT Neil

Résumé

L'exposition de fibroblastes IMR-90 à un stress subléthal avec du peroxyde d'hydrogène entraîne l'apparition de marqueurs de la sénescence. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer une morphologie cellulaire typique, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, un arrêt irréversible du cycle cellulaire ainsi que la surexpression de certains gènes associés au vieillissement.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de la cavéoline-1 dans l'établissement de la sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) des fibroblastes IMR-90 stressés avec du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, nous avons montré que l'abondance relative de la cavéoline-1 ainsi que sa forme phosphorylée augmente dès les temps courts qui suivent le stress mais également à plus long terme. De plus, nous avons mis en évidence que cette protéine est impliquée dans le blocage du cycle cellulaire normalement observé lors de la SIPS. Contrairement à cela, la cavéoline-1 ne semble pas jouer de rôle dans l'augmentation de proportion de la population cellulaire positive pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence.

Ces résultats préliminaires suggèrent que la cavéoline-1 pourrait faire partie des mécanismes impliqués dans l'établissement de la sénescence prématurée de fibroblastes IMR-90 suite à un stress subléthal avec du peroxyde d'hydrogène.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2006

**Promoteur:** O. Toussaint

VLS 20069266

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans toute une équipe pour m'aider, me soutenir et m'encourager dans les moments difficiles.

Je remercie tout d'abord Monsieur le professeur Olivier Toussaint et toute l'équipe des « GRAS » de m'avoir accueillie. J'ai appris énormément en travaillant dans le labo.

Un grand merci à Aline Chrétien. Je sais, j'ai souvent été insupportable, j'espère qu'elle me pardonnera. Elle m'a beaucoup aidé et a passé beaucoup de temps à la correction de ce mémoire.

Je lui souhaite une grande réussite dans son doctorat.

Je n'oublie pas non plus toute l'équipe du labo, Edouard , Noëlle et Catherine, Marc (non je ne fait pas partie des meubles), Coralie, ...

Merci aussi aux autres mémorants pour les agréables moments passés ensemble. La bonne humeur, les coups de cafards, la sympathie régnaient dans la salle

Enfin, je remercie mes parents pour leur soutien et mon frère toujours d'accord pour m'aider et résoudre les « pannes informatiques » inévitables dans un tel travail.



## Table des matières

### Première partie : introduction

<b>I.</b>	<b>Contexte général</b>	1
<b>II.</b>	<b>Sénescence rélicative</b>	1
<b>III.</b>	<b>Sénescence Induite Prématûrement par les Stress ou SIPS</b>	2
<b>IV.</b>	<b>Les marqueurs de la sénescence</b>	2
	IV.1 Modification morphologique	2
	IV.2 Modification histochimique : activité b-galactosidase associée à la sénescence	3
	IV.3 Raccourcissement des télomères	3
	IV.4 Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 /S	4
	IV.4.1 Le cycle cellulaire	4
	IV.4.2 Régulation du cycle cellulaire	4
	a) les CDK/cyclines	5
	b) P53	5
	c) La protéine du rétinoblastome	6
	IV.4.3 Mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire dans la SIPS et la sénescence rélicative	6
	IV.4.4 Signification biologique de l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence	6
	IV.5 Altération du génome mitochondrial	7
	IV.6 Modification de l'expression génique	7
<b>V.</b>	<b>Sénescence prématurée des fibroblastes IMR-90 induite par une exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	8
<b>VI.</b>	<b>RAC-1</b>	9
	VI.1 Introduction	9
	VI.2 Régulation des GTPases	10
	VI.3 Effecteurs des Rho GTPases	10
	VI.4 Les Rho GTPases et le cytosquelette d'actine	11
	VI.5 Rôle des GTPases dans la progression du cycle cellulaire et la régulation transcriptomique	13
<b>VII.</b>	<b>La cavéoline</b>	13
	VII.1 Introduction	13
	VII.1.1 Les cavéoles	13
	VII.1.2 La cavéoline	14
	VII.2 Cavéoline, sénescence rélicative et SIPS	15

### Deuxième partie : But du mémoire.....17

### Troisième partie : Matériels et méthodes.....18

<b>I.</b>	<b>Culture et stress sublétaI des fibroblastes IMR-90</b>	18
	I.1 Culture cellulaire : Repiquage de fibroblastes IMR-90	18
	I.2 Exposition des fibroblastes IMR-90 à un stress sublétaI à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18
<b>II.</b>	<b>Détection des marqueurs de la sénescence</b>	19
	II.1. Activité SA β-gal	19
	II.2. Incorporation de la [3H]-thymidine	20



II.3. Dosage protéique par la méthode de Folin.....	20
<b>III. Western-Blotting.....</b>	<b>21</b>
III.1. Extraction protéique.....	21
III.2. Dosage des échantillons protéiques par la méthode de Bradford.....	21
III.3. Séparation des protéines par SDS-Page.....	22
III.3.1 Préparation des gels.....	22
III.3.2 Traitement des échantillons.....	22
III.4 Transfert sur membrane.....	23
III.5 Traitement de la membrane.....	23
<b>IV. Marquage en Immunofluorescence.....</b>	<b>24</b>
<b>V. Détection de l'activité de Rac-1.....</b>	<b>25</b>
V.1 Lyse cellulaire .....	25
V.2 Préparation d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif par traitement in vitro de lysats cellulaires avec du GTPγS ou du GDP.....	26
V.3 Précipitation d'affinité de Rac1.....	26
<b>VI. Transfection des IMR-90 avec des ARN interférents spécifiques des transcrits de la cavéoline-1.....</b>	<b>26</b>
<b>VII. Extraction d'ARN total.....</b>	<b>27</b>
VII.1 Extraction d'ARN total.....	28
VII.2 Précipitation et resuspension de l'ARN total.....	28
VII.3 Lavage de l'ARN total.....	28
<b>VIII. Transcription inverse.....</b>	<b>28</b>
<b>IX. PCR en temps réel.....</b>	<b>29</b>
 <b><u>Quatrième partie : Résultats et Discussion.....</u></b>	 <b>31</b>
<b>I. Etude des marqueurs de la sénescence pour des fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>31</b>
I.1 Activité b-galactosidase associée à la sénescence.....	31
I.2 Estimation du potentiel prolifératif.....	32
I.2.1 Incorporation de la thymidine tritiée.....	32
I.2.2 Abondance protéique de l'inhibiteur de CDK/cycline : p21WAF-1.....	32
<b>II. Etude du niveau relatif protéique de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>33</b>
II.1 Mises au point du marquage en immunofluorescence de la cavéoline-1 .....	33
II.1.1 Résultats obtenus par utilisation du protocole 1.....	34
II.1.2 Résultats obtenus par utilisation du protocole 2.....	34
II.1.3 Résultats obtenus par utilisation du protocole 3.....	34
II.1.4 Résultats obtenus par utilisation du protocole 4.....	34
II.1.5 Résumé des résultats obtenus par l'utilisation des 4 protocoles de fixation/perméabilisation pour l'analyse de la cavéoline-1 en marquage par immunofluorescence.....	35
II.2 Etude de la localisation subcellulaire de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène.....	35
II.3 Etude des variations d'expression au niveau protéique de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène.....	36
<b>III. Utilisation des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1.....</b>	<b>37</b>
III.1 Mise au point des conditions de PCR en temps réel.....	37
III.2 Mises au points de la transfection des IMR-90 avec des siRNA spécifiques des transcrits de la cavéoline-1.....	38

III.2.1 Détermination de la concentration optimale en siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 .....	38
III.2.2 Détermination de la durée d'action des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 .....	39
III.3 Etude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition des marqueurs de sénescence.....	40
III.3.1 Contrôle de transfection.....	40
III.3.2 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur le potentiel prolifératif ...	41
a) Incorporation de la thymidine tritiée.....	41
b) Niveau d'expression protéique de l'inhibiteur de CDK/cycline: p21 WAF-1.....	41
III.3.3 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur l'activité b-galactosidase associée à la sénescence.....	42
III.4 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur l'activation de Rac1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène.	42
III.4.1 Contrôle de transfection.....	43
III.4.2 Effet de l'inhibition de la cavéoline-1 sur l'abondance relative de Rac1 actif dans les fibroblastes IMR-90 en SIPS induite par le peroxyde d'hydrogène .....	43
<b><u>Cinquième partie : Conclusions et perspectives</u></b> .....	45
<b><u>Sixième partie : Bibliographie</u></b> .....	49

**Préfixes**

c	Centi-
m	Milli-
m	Micro-
n	Nano-
p	Pico-

**Unités**

°C	Degré Celsius
A	Ampères
Ci	Curie
Da	Dalton
g	Grammes
g	Unité de gravité
h	Heure
l	Litre
m	Mètre
M	Molaire
min	Minute
mol	Mole
rpm	Tours par minute
sec	Seconde
U	Unité enzymatique
V	Volt

**Autres**

<sup>3</sup> H	Tritium
AB	Antibiotique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
APS	Amonium persulfate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
CAK	CDK activating protein
Cdk	Cyclin Dependent Kinase
Ct	Cycle seuil



## Liste des abréviations

---

ddH <sub>2</sub> O	Eau bi-distillée
DH	Dbl Homology
DMSO	DiméthylSulfoxide
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiotréitol
ECL	Enhanced Chemo Luminescence
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endothelial nitric oxyde synthase
ERK MAP kinase	Extracellular signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
FAK	Kinase des adhésions focales
FBS	Fœtal Bovin Serum
GAP	GTPase Activating Protein
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Nucléotide Exchange Factor
GPC	Récepteurs couplés aux protéines G
GPI	Glycosylated phosphatidylinositol anchor
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GST	Glutathion S Transférase
GTP	Guanosine Triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HDFs	Human Diploid Fibroblasts
IP3	Inositol trisphosphate
JNK	Jun N-terminal Kinase
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LIMK	LIM Kinase
LPA	Acide lysophosphatidique
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Modified Eagle Medium
MF	Morphotypes mitotiques
MLC	Chaîne légère de la myosine
MPF	Mitose Promoting Factor
NADH	Forme réduite de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PA	Phosphatidic acid
PAK1	p21-activated kinase 1
pb	Paire de base
PBD	p21 Binding Domain
PBS	Tampon phosphate salin
PCI	Phenol Chloroform Isoamyl

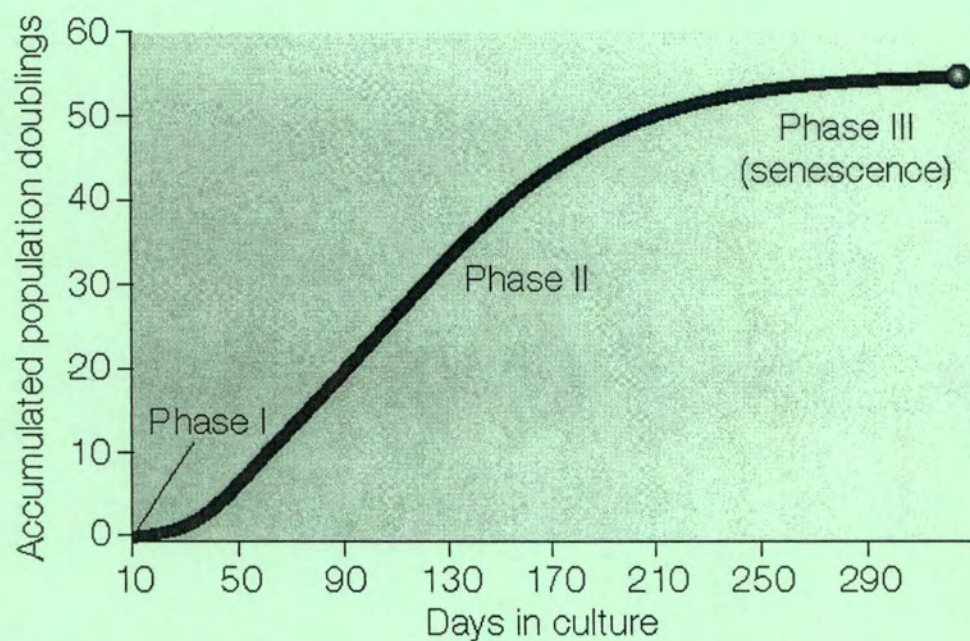
## Liste des abréviations

---

PCR	Polymerase chain Reaction
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PFA	Paraformaldéhyde
pH	Potentiel hydrogène
PH	Pleckstrine Homology
PI-3K	Phosphoinositide-3 kinase
PI-4-5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase
PKN	Protein kinase N
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMF	Morphotypes post-mitotiques
POR-1	Partenaire de RAC
pRb	Protéine du rétinoblastome
PVDF	Polyvinylidènefluoride
R	Point de restriction
RISC	RNA-Induced-Silencing Complex
RNAse	Ribonucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteurs aux tyrosines kinases
SA $\beta$ -Gal	Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIPS	Sénescence induite prématurément par un stress
siRNA	Small interfering RNA
SM22	Smooth muscle 22
SR	Sénescence répllicative
SRE	Elément de réponse au sérum
SRF	Serum Responsive Factor
T25	Boîte de culture de 25 cm <sup>2</sup>
T75	Boîte de culture de 75 cm <sup>2</sup>
<i>t</i> -BHP	<i>Tert</i> -butylhydroperoxide
TBS	Tris Buffer Saline
TBS-T	TBS-tween
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
UV	Ultraviolet
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASP-like Verpolin-homologous protein
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranoside



# Introduction



**Figure I.1 :** Représentation graphique des trois phases qui caractérisent une culture cellulaire selon Hayflick. La phase I se situe entre la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. La phase II représente les sous-cultures cellulaires. Durant cette période, la réplique est exponentielle. La phase III représente la période pendant laquelle la réplique cellulaire ralentit puis s'arrête (Shay *et al.*, 2000).



## **Première partie : Introduction**

### **I. Contexte général**

Chaque jour, les cellules d'un organisme sont soumises à des stress de multiples natures. Un stress peut être défini comme « un acteur environnemental défavorable à un organisme vivant », ou comme « un agent biologique provoquant une réaction d'agression de l'organisme ». Ces définitions font intervenir deux paramètres : l'agent stressant et la réponse de l'organisme face au stress. Le premier peut par exemple provoquer un stress osmotique, chimique, thermique, biologique, etc. *In vivo*, les cellules d'un individu peuvent être exposées, entre autres, à des stress oxydatifs. Ceux-ci varient selon leur localisation au sein de l'organisme, par exemple des pneumocytes confrontés à la fumée de tabac, à l'ozone ou à la pollution urbaine. Les stress oxydatifs peuvent varier selon les circonstances : par exemple, des cellules présentes dans des zones d'inflammation, d'hypertension, des cellules soumises à des LDL (lipoprotéine de faible densité) oxydées, à du cholestérol, ou des cellules de muscles soumis à un effort important, etc.

Il existe trois phases dans la réponse biologique au stress. Dans un premier temps, il y a une déviation des fonctions normales, ainsi qu'une augmentation du catabolisme par rapport à l'anabolisme. Dans un second temps, des processus d'adaptation et de réparation sont mis en place. On parle de la phase de résistance ou de restitution. Enfin, la troisième phase est soit l'étape de régénération soit l'étape d'épuisement. Si le retrait de l'agent stressant permet la restauration des fonctions physiologiques, on parle de régénération. Par contre, si l'intensité du stress est trop importante et que l'organisme considéré ne peut s'adapter face aux dommages, on parle d'épuisement. Dans ce cas il y a apparition de maladies chroniques, du vieillissement ou de la mort cellulaire (Lichtenhaler *et al.*, 1998).

Des stress sublétaux peuvent accélérer le processus de vieillissement cellulaire et entraîner l'apparition de ces principaux marqueurs que sont l'altération morphologique, la perte du potentiel prolifératif etc.

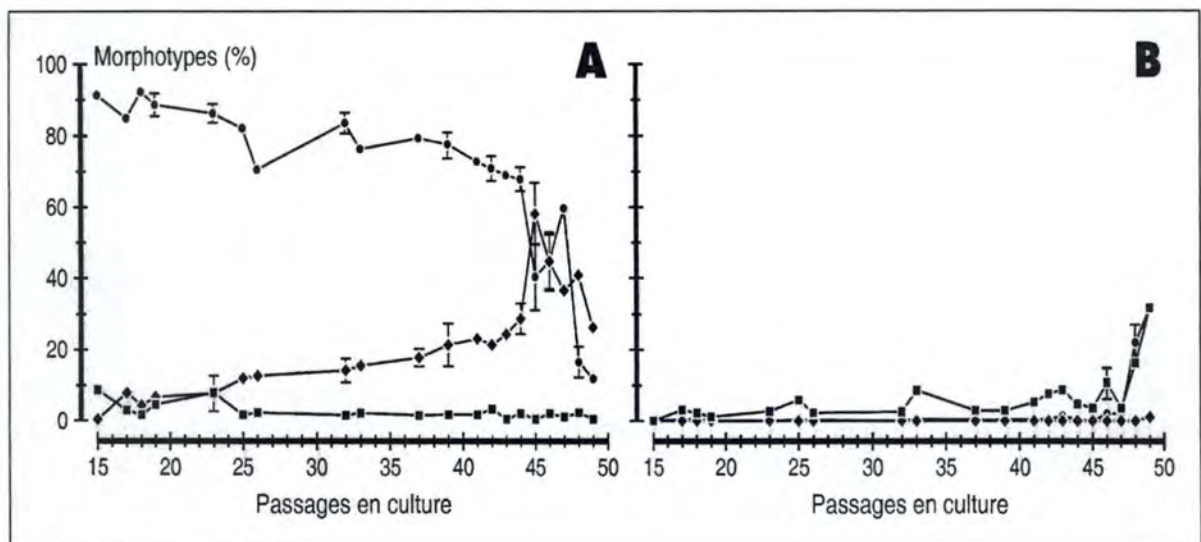
### **II. Sénescence répllicative**

En 1961, Hayflick et Moorhead ont démontré un arrêt de prolifération de fibroblastes de poumon fœtal humain après une cinquantaine de passages en culture. Ils ont interprété ce résultat comme étant le vieillissement au niveau cellulaire. L'arrêt de prolifération a lieu pour des cellules non transformées. Ils ont également établi que l'évolution des cultures cellulaires pouvait se diviser en trois phases (**figure I.1**):

La première phase se situe entre la mise en culture d'un explant et l'établissement d'une culture primaire. Il s'agit d'une phase de latence dont la durée augmente avec l'âge du donneur.

La deuxième phase est une phase de croissance exponentielle (40 à 45 passages en culture si le nombre maximal de passages est de 50).

Lors de la troisième phase, les cellules présentent un rythme de division plus lent jusqu'à mener à l'arrêt définitif des divisions. Ceci correspond à la sénescence répllicative. Elle est suivie par la dégénérescence cellulaire avant d'atteindre la mort cellulaire. Les cellules sont toujours métaboliquement actives. Elles peuvent demeurer dans cet état pendant un an avant



**Figure I.2 :** Représentation graphique de la proportion des morphotypes des fibroblastes AG04432 en fonction des passages en culture. A. Morphotypes mitotiques : les carrés représentent le pourcentage de MF I ; les ronds représentent le pourcentage de MF II et les losanges représentent le pourcentage de MF III. B. Morphotypes postmitotiques : les carrés représentent le pourcentage de PMF IV ; les ronds représentent le pourcentage de PMF V et les losanges représentent le pourcentage de PMF VI (Toussaint *et al.*, 1998).



de mourir (pour une revue Shay *et al.*, 2000). La limite de Hayflick ou sénescence réplivative (SR) a ensuite été observée pour d'autres types cellulaires et dans diverses espèces.

La relation entre sénescence réplivative et vieillissement *in vivo* a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi George Martin a proposé en 1970 qu'il existait une relation linéaire entre l'âge du donneur de fibroblastes et le nombre de doublements de population que les cellules pouvaient effectuer *in vitro*. Cependant, quelques années plus tard, une étude à plus grande échelle a infirmé cette relation (Cristofalo *et al.*, 1998). Tesco et son équipe ont également montré que le potentiel prolifératif des fibroblastes provenant de biopsies de centenaires ou d'individus jeunes pouvait être équivalent (Tesco *et al.*, 1998). De plus il a été montré qu'il n'y avait pas de relation entre la durée de vie proliférative et la durée de vie maximale de l'espèce (Cristofalo *et al.*, 1994).

### **III. Sénescence Induite Prématurément par les Stress ou SIPS**

*In vitro*, de nombreux types cellulaires ayant été soumis à un ou des stress sublétaux présentent un phénotype appelé sénescence induite prématurément par les stress (SIPS). Différents stress peuvent induire la SIPS : le *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) (Toussaint *et al.*, 1992), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chan *et al.*, 1994) et la mitomycine C (Rodemann *et al.*, 1989) en sont quelques exemples. Ces stress peuvent être uniques ou répétés. La répétition du stress permet de diminuer la concentration en agent stressant. La SIPS peut être définie comme étant le résultat obtenu à long terme après le ou les stress subcytotoxique(s) sur des cellules prolifératives. La sénescence prématurée a notamment été démontrée pour des fibroblastes de peau et de poumon (von Zglinicki *et al.*, 1995), des mélanocytes humains (Horikoshi *et al.*, 1986), des cellules endothéliales (Michiels *et al.*, 1990), etc.

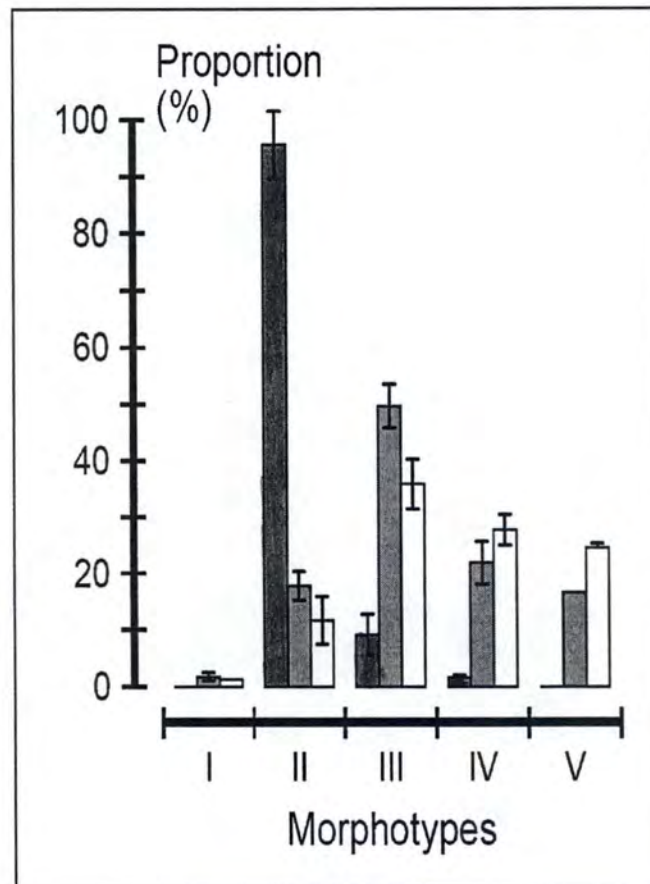
De nombreuses caractéristiques sont communes entre la sénescence réplivative et la SIPS. Nous les passons en revue ci-dessous.

### **IV. Les marqueurs de la sénescence**

#### **IV.1 Modification morphologique**

C'est en 1988 que Bayreuther et son équipe ont proposé une classification sérieée des fibroblastes selon 7 types morphologiques (morphotypes) distincts. Bayreuther a proposé que ces morphotypes représentaient des états distincts de différenciation. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être démontrée expérimentalement. L'analyse des différents morphotypes reste néanmoins un outil intéressant pour étudier les effets éventuels sur l'accélération du processus de vieillissement induit par un ou plusieurs stress subcytotoxique(s).

Au cours des passages en culture, on observe une évolution des morphotypes dits « mitotiques » (MF I, II et III) vers des morphotypes dits « post-mitotiques » (PMF IV, V, VI et VII). Le pourcentage de MF I pour des fibroblastes humains de souche WI-38 (poumon fœtal), AG04432 (poumon fœtal) ou HH-8 (de peau adulte) n'atteint plus que 10% après 15 passages en culture. A ce moment, le morphotype II représente 90% de la population cellulaire. Il est ensuite remplacé par des morphotypes III. Les morphotypes post-mitotiques apparaissent lentement et s'accumulent lors des derniers passages en culture (Toussaint *et al.*, 1998) (**figure I.2**).



**Figure I.3 :** Représentation graphique de la proportion des différents morphotypes observés dans une culture de fibroblastes WI-38. En gris foncé, des fibroblastes jeunes (faible nombre de passages en culture) ; en gris, des fibroblastes en sénescence répliative; en blanc, des fibroblastes WI-38 jeunes ayant subi cinq stress successifs de 2h en présence de *t*-BHP 100  $\mu$ M à raison d'un stress par jour. Les morphotypes sont observés deux jours après le dernier stress (Toussaint *et al.*, 1998).



Lorsque des fibroblastes sont soumis à un ou des stress subcytotoxique(s), comme par exemple aux UV, à la mitomycine C, (Bayreuther *et al.*, 1988), au *t*-BHP ou à l'éthanol (Toussaint *et al.*, 1992), on observe une accélération de transition entre les différents morphotypes. Les fibroblastes acquièrent alors une morphologie sénescence (**figure I.3**).

Une étude protéomique a démontré, par utilisation de gels en 2 dimensions, que chaque morphotype exprime certaines protéines particulières (Rodemann *et al.*, 1989).

D'autres études ont démontré qu'il existe un parallélisme entre le vieillissement observé *in vivo* et *in vitro*. En effet, il existe une corrélation entre l'âge du donneur et le pourcentage de chaque morphotype dans la population cellulaire (Bayreuther *et al.*, 1988). Il existe également une corrélation entre le pourcentage de cellules positives pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence et les morphotypes âgés.

## **IV.2 Modification histochimique : activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence**

La  $\beta$ -galactosidase est une hydrolase lysosomiale qui clive le lactose en galactose et glucose. Cette activité est détectée normalement à pH 4. En 1995, l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -Gal) a été découverte. Celle-ci est détectée à pH 6 dans les cellules sénescence par coloration histochimique en utilisant le X-Gal comme substrat artificiel. Cette activité a alors été détectée dans plusieurs types cellulaires sénescence. Par exemple les kératinocytes humains (Dimri *et al.*, 1995), les cellules endothéliales humaines (Kurz *et al.* 2000), les cellules mammaires (Michishita *et al.*, 1999), les mélanocytes (Medrano *et al.*, 1995) et les cellules musculaires lisses d'humain et de lapin (van der Loo *et al.*, 1998).

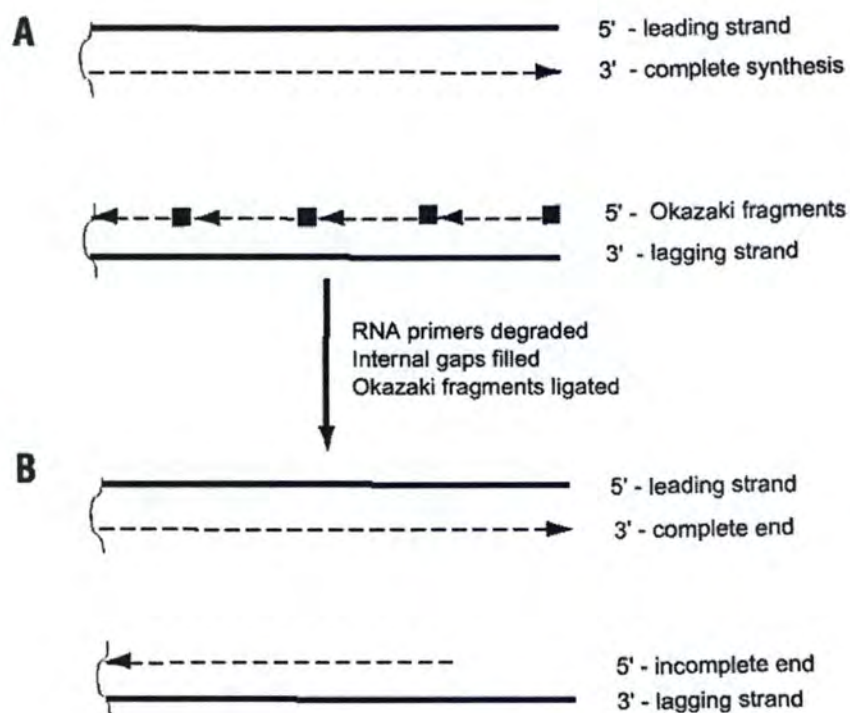
On peut proposer deux hypothèses pour expliquer la détection de l'activité SA  $\beta$ -gal à pH 6 dans les cellules en sénescence répliquative et en SIPS. Premièrement l'élargissement du pic de détection de cette activité pour ces cellules peut s'expliquer par l'augmentation du nombre et de la taille des lysosomes (Kurz *et al.*, 2000) ainsi qu'une augmentation de la quantité de lipofuscine et d'autophagosomes dans les cellules. L'augmentation de la quantité d'autophagosomes serait due à une augmentation de l'autophagie durant le vieillissement *in vitro* (Gerland *et al.*, 2003). Deuxièmement, il y aurait une surexpression du gène de la  $\beta$ -gal sous le contrôle du facteur de transcription ATF-2 activé par  $p38^{MAPK}$  (Lee *et al.*, 2006).

L'augmentation de la proportion des cellules positives pour la SA  $\beta$ -gal a aussi été observée pour différents types cellulaires en sénescence prématurée induite par les UVB (Chainiaux *et al.*, 2002), le *t*-BHP (Dumont *et al.*, 2000), l' $H_2O_2$  (Fripiat *et al.*, 2002), etc.

En ce qui concerne l'activité SA  $\beta$ -gal, il existe un parallélisme entre des données obtenues *in vivo* et *in vitro*. En effet, les cellules du derme ou de l'épiderme des individus âgés présentent une activité SA  $\beta$ -gal plus élevée que les individus jeunes (Dimri *et al.*, 1995).

## **IV.3 Raccourcissement des télomères**

Les télomères sont des séquences hautement répétées (sur 10-15 pb), non codantes et situées aux extrémités des chromosomes. Chez les mammifères, cette séquence est TTAGGG (Meyne *et al.*, 1989). La répétition des nombreuses guanines facilite la constitution de structures tridimensionnelles très stables. De cette façon, les télomères permettent la stabilisation des chromosomes (Gilson *et al.*, 1993). En effet, ils empêchent leur dégradation



**Figure I.4 :** Réplication de l'ADN chromosomique et raccourcissement des télomères. La réplication de l'ADN par l'ADN polymérase est unidirectionnelle : de 5' en 3'. Un des brins parental est copié de manière discontinue. La réplication est initiée à partir de fragments labiles d'ARN, des amorces (carré noir). il y a formation des fragments d'Okazaki. Les amorces sont ensuite dégradées et les lacunes sont comblées par de l'ADN, les fragments d'Okazaki sont reliés entre eux. Cependant, le remplacement ne se fait pas à l'extrémité du brin d'ADN, la région terminale n'est donc pas répliquée. Il y a donc un raccourcissement des télomères (Rubin *et al.*, 2002).



par des exonucléases, ils préviennent les recombinaisons illégitimes et empêchent la fusion des chromosomes.

Lors de chaque division cellulaire, la réplication de l'ADN se fait de 5' en 3'. Pour ce faire, une amorce d'ARN est placée sur l'extrémité 3' de l'ADN linéaire du chromosome. Après quoi une primase permet de démarrer la réplication. Celle-ci une fois terminée, l'amorce se dissocie de l'ADN. Un espace est donc laissé par celle-ci (**figure I.4**). Le rôle de la télomérase, une ribonucléoprotéine proche de la rétrotranscriptase virale, est de stabiliser les télomères en ajoutant des séquences TTAGGG aux extrémités des chromosomes, compensant le raccourcissement télomérique lié aux mitoses. On observe une élongation du télomère à partir d'une matrice d'ARN incluse dans la télomérase.

La télomérase est inactive dans les cellules somatiques humaines. Au cours des divisions cellulaires, les télomères raccourcissent donc de plus en plus. C'est pour cette raison qu'ils sont définis comme étant des horloges biologiques de la cellule. Les télomères courts peuvent être reconnus comme des dommages à l'ADN.

Une relation directe entre le raccourcissement des télomères et l'âge du donneur a été démontré par Lindsey (Lindsey *et al.*, 1991). Ce raccourcissement a aussi été caractérisé dans des cellules en culture ; plus le nombre de passage en culture des cellules est élevé, plus la taille des télomères diminue (Harley *et al.*, 1990). Le raccourcissement des télomères dans la SIPS est controversé.

#### **IV.4 Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 /S**

##### **IV.4.1 Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire peut se subdiviser en cinq phases :

- La phase G0 avec G" pour "gap" ou "growth". C'est la phase dite de quiescence durant laquelle la cellule ne se divise pas. Les cellules en phase G0 peuvent entrer en phase G1 après stimulation par des facteurs mitogènes.
- La phase G1 : lors de cette phase, les cellules fabriquent tout ce qui est nécessaire pour leur division : les déoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), les protéines, les sucres, les organites, etc, ainsi que l'appareil nécessaire à la duplication de l'ADN.
- La phase S durant laquelle la duplication du génome a lieu.
- La phase G2 permet la mise en place des mécanismes nécessaires pour la mitose, dont le fuseau mitotique.

Ces quatre premières phases font partie de l'interphase c'est-à-dire l'ensemble des phases entre deux divisions successives.

- La phase M correspond à la division cellulaire proprement dite.

##### **IV.4.2 Régulation du cycle cellulaire**

Trois étapes du cycle cellulaire sont particulièrement régulées.

- Le passage de G0 à G1, est régulé par la présence d'agents mitogènes;
- Le passage de G1 à S, où il existe un point de contrôle nommé point de restriction (R). Une fois ce R passé, les cellules sont contraintes de se diviser. Ce point est très régulé, notamment par l'ampleur des dommages à l'ADN ainsi que par la longueur télomérique;



- Le passage de la phase G2 à M. Ce passage est régulé par un complexe formé d'une protéine appelée cycline B, associée à la Cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1). Ce complexe est appelé MPF (Mitose Promoting Factor).

Il existe 3 acteurs principaux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire : les CDK/cyclines, p53 et la protéine du rétinoblastome.

#### a) les CDK/cyclines

Les kinases dépendantes des cyclines sont des sérine/thréonine kinases. Leur activité est contrôlée par de petites protéines, les cyclines (sous-unité régulatrice activatrice), par des inhibiteurs ainsi que par la CAK (CDK activating protein).

Il existe différentes cyclines qui sont exprimées de manière séquentielle au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi on peut discerner les cyclines mitotiques (cyclines A et B) des cyclines actives en phase G1 (cycline C, D et E). Les cyclines F, G et H ne sont pas restreintes à une étape du cycle cellulaire. Chaque cycline s'associe à une ou différentes CDK au cours du cycle cellulaire, ce qui permet la régulation de ce dernier. Ci-dessous un tableau récapitulatif des différents rôles des divers complexes CDK/cyclines :

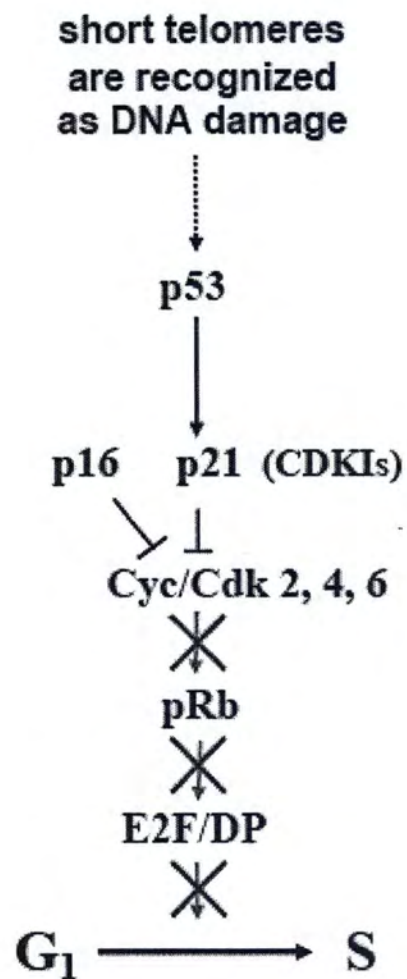
CDK	Poids moléculaire (KDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
CDK 1	34	Cycline B Cycline A	p21 <sup>Waf-1</sup> p27 <sup>KIP-1</sup>	Déclenchement de la mitose
CDK 2	33	Cycline A Cycline E	p21 <sup>Waf-1</sup> p27 <sup>KIP-1</sup>	Régulation de la réplication de l'ADN (par l'intermédiaire de E2F ?) Phosphorylation de Rb
CDK 3	36	?	?	Régulation de la phase G1 ?
CDK 4	34	Cycline D	p21 <sup>Waf-1</sup> , p27 <sup>KIP-1</sup> p15 <sup>INK-5B</sup> , p16 <sup>INK-4A</sup>	Phosphorylation de Rb
CDK 5	35	Cycline D ?	p21 <sup>Waf-1</sup> ?	Participation au métabolisme
CDK 6	40	Cycline D	p15 <sup>INK-5B</sup> , p16 <sup>INK-4A</sup> , p18 <sup>INK-4C</sup>	Phosphorylation de Rb
CDK 7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

**Tableau 1.1:** Tableau représentant les différentes CDK, leur poids moléculaire, la sous-unité régulatrice, leurs inhibiteurs spécifiques ainsi que leurs fonctions cellulaires spécifiques (d'après, Wolowiec, 1996).

On peut distinguer plusieurs types d'inhibiteurs de CDKs ; les inhibiteurs de la famille INK4 tels que p16<sup>INK-4A</sup> se lient aux complexes CDK/cycline. Cette liaison provoque la dissociation du complexe et empêche sa réassociation ultérieure. Les inhibiteurs de la famille KIP/CIP tel que p21<sup>Waf-1</sup> inhibent les complexes à la phase G1. Les kinases activatrices de CDKs (CAK) permettent l'activation des CDKs par phosphorylation d'un résidu thréonine.

#### b) P53

P53 est un facteur de transcription qui régule le cycle cellulaire. En conditions normales, MDM2, une ubiquitine ligase, conduit à l'ubiquitinylation de p53. p53 est alors dégradée par le protéasome. Suite à des dommages à l'ADN, MDM2 est inhibé par ARF. p53 n'est plus



**Figure I.5 :** Représentation schématique de la voie de transduction du signal menant à l'arrêt du cycle cellulaire mis en place dans la SIPS suite à des dommages à l'ADN (<http://senescence.info/telomeres.html>).



dégradée, est stabilisée et activée par phosphorylation. p53 induit la production de p21<sup>Waf-1</sup> ce qui entraîne le blocage du cycle cellulaire via la protéine du rétinoblastome.

### c) La protéine du rétinoblastome

La protéine du rétinoblastome (pRb) est une protéine suppresseur de tumeurs. pRb fut initialement découverte comme étant à l'origine d'une tumeur de l'œil chez l'enfant, le rétinoblastome. La mutation des deux allèles du gène codant pour la protéine Rb suffit pour entraîner une prolifération anarchique des cellules conduisant à un développement tumoral. Ces résultats ont alors rapidement montré que Rb était un inhibiteur important du cycle cellulaire, la disparition de son activité entraînant une forte dérégulation de la prolifération.

La progression du cycle cellulaire repose sur l'activation du facteur de transcription E2F1. En se fixant sur l'ADN, E2F1 active la transcription de nombreux gènes nécessaires à la phase S. Ce facteur de transcription ne peut fonctionner qu'en formant un hétérodimère avec la protéine DP. Ces conclusions reposent sur des expériences de transfection qui indiquent que la surexpression de E2F1 active directement la progression vers la phase S même si les cellules ne sont pas stimulées par un mitogène. L'activité de E2F1 est étroitement régulée au cours du cycle cellulaire. Au cours de la phase G1, pRB peut se lier à E2F1. Ceci l'empêche d'interagir avec d'autres protéines formant le complexe de l'ARN polymérase. Ceci bloque donc l'activité transcriptionnelle de E2F1. Lorsque la cellule approche de la transition G1/S, pRb est phosphorylée par le complexe CDK (2, 4 et 6)/cyclineD. pRB libère alors E2F1. La cellule peut donc poursuivre son cycle à travers la phase S.

### **IV.4.3 Mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire dans la SIPS et la sénescence répllicative**

La sénescence répllicative conduit à l'arrêt du cycle cellulaire. Celui-ci a lieu en fin de phase G1, empêchant le passage en phase S.

L'arrêt du cycle cellulaire chez les cellules sénescents semble être induit en partie par les dommages à l'ADN, par exemple, le raccourcissement des télomères. MDM2 est alors inactivé empêchant la dégradation de p53. p53 est activé par phosphorylation, ce qui induit la transcription de différents gènes dont celui de la protéine p21<sup>Waf-1</sup>. Celle-ci est en effet surexprimée dans les fibroblastes WI-38 en sénescence répllicative et les fibroblastes WI-38 jeunes soumis à 5 stress au t-BHP (Dumont *et al.*, 2000). Ensuite, le niveau d'expression de P21<sup>Waf-1</sup> diminue, mais un autre inhibiteur de complexe CDK/cycline prend le relais ; Il s'agit de p16<sup>INK-4a</sup>. Ces inhibiteurs empêchent la phosphorylation de pRb via les complexes CDK(2, 4 et 6)/cycline D et donc bloquent la progression du cycle cellulaire (**figure I.5**) (Pour une revue Campisi *et al.*, 1996).

### **IV.4.4 Signification biologique de l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence**

La sénescence répllicative et la SIPS sont donc caractérisées par l'arrêt de prolifération de la majorité de la population cellulaire. Celle-ci peut être observée par une diminution de la capacité de synthèse de l'ADN au cours des passages en culture de fibroblastes humains. Cette observation est mise en évidence en suivant l'incorporation de thymidine tritiée au cours des passages en culture (Cristofalo *et al.*, 1973). La sénescence est donc un obstacle à la croissance de la population cellulaire en culture. Ce mécanisme pourrait donc jouer le rôle de suppresseur de tumeurs (Wright *et al.*, 2001).



Une relation inverse est observée entre l'incorporation de la thymidine tritiée et le pourcentage de cellules positives pour la SA  $\beta$ -gal.

#### **IV.5 Altération du génome mitochondrial**

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est une molécule circulaire (épisode), double brins, multicopies, d'origine maternelle et fermé par liaison covalente. Il se situe dans la matrice mitochondriale. Ces 16569 paires de bases codent pour une partie des protéines impliquées dans la respiration mitochondriale et la réplication de l'ADNmt. Le génome mitochondrial ne code donc pas toutes les protéines de la mitochondrie. Il faut donc une coordination entre les génomes mitochondriaux et nucléaires pour l'expression de protéines mitochondriales.

Au cours du vieillissement, l'ADNmt subit de nombreux dommages (mutations, délétions) dont une délétion de 4977 pb aussi appelée délétion commune vue sa fréquence plus élevée. La fréquence de cette délétion augmente avec l'âge *in vivo*. Ceci a été démontré pour différents tissus tels que la peau (Pang *et al.*, 1994 et Yang *et al.*, 1994), le cœur, les reins (Liu *et al.*, 1998), les muscles squelettiques (Lee *et al.*, 1994), les poumons (Fahn *et al.*, 1996), etc. La délétion commune est détectée dans les mitochondries des cellules en SIPS et en SR (Dumont *et al.*, 2000).

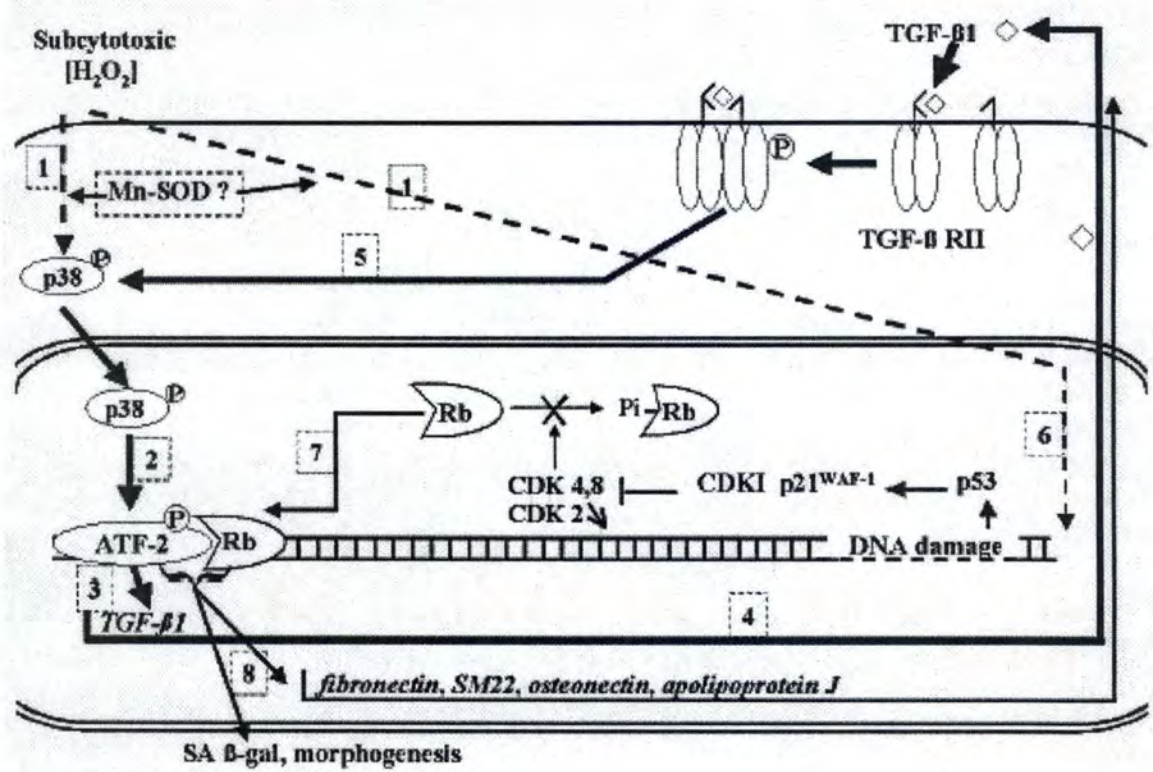
Notons que les délétions de l'ADNmt sont plus fréquentes dans les tissus exposés à la lumière comme la peau (Pang *et al.*, 1994) et dans les tissus très actifs au niveau de la respiration mitochondriale comme le foie, les muscles ou le cerveau. Ces observations laissent penser que les radicaux libres (ROS) favorisent les délétions de l'ADNmt (Filser *et al.*, 1997). Or, ces délétions altèrent les protéines de la chaîne de transport d'électrons. La production de ROS va donc être de nouveau augmentée.

#### **IV.6 Modification de l'expression génique**

Gonos et ses collaborateurs ont montré en 1998 que plusieurs gènes dont la fibronectine, l'ostéonectine et l'apolipoprotéine J étaient surexprimés chez les fibroblastes sénescents de rats (Gonos *et al.*, 1998). Ces gènes sont aussi surexprimés chez les fibroblastes en sénescence induite prématurément par des expositions au *t*-BHP, à l' $H_2O_2$  (Dumont *et al.*, 2000) ou aux UVB (Debaq-Cainiaux *et al.*, 2005).

La fibronectine est une glycoprotéine extracellulaire ubiquitaire représentant un composant essentiel de la matrice extracellulaire (MEC). Elle peut être présente sous forme soluble dans les liquides de l'organisme et sous forme insoluble dans la MEC. Elle est sécrétée par des cellules mésenchymateuses (en particulier les fibroblastes) et par certaines cellules épithéliales. La fibronectine présente de nombreux sites de liaison pour des protéines de la MEC (comme le collagène, la thrombospondine), des récepteurs membranaires (intégrines), des glucosaminoglycanes et des protéines circulantes du sang (fibrine). Elle est notamment impliquée dans l'adhésion cellulaire, dans l'organisation du cytosquelette, dans la médiation des signaux mitogéniques et dans les processus de réparation (Kumazaki *et al.*, 1993). Ces caractéristiques en font un bon candidat pour expliquer les changements morphologiques ayant cours lors de la SIPS. Le gène de la fibronectine est aussi surexprimé dans les fibroblastes de patients atteints par le syndrome de Werner (Murano *et al.*, 1991). Le syndrome de Werner est une maladie récessive. Les patients atteints de cette maladie souffrent d'un vieillissement prématuré.





**Figure I.6 :** Représentation schématique illustrant les voies de transduction du signal du TGF-β1 et de p38<sup>MAPK</sup> dans l'apparition de la SIPS des fibroblastes IMR-90 (Toussaint *et al.*, 2003).

L'ostéonectine est induite chez les fibroblastes par les stress tels qu'une altération tissulaire ou un choc thermique. Elle lie le calcium, empêchant ainsi l'entrée des cellules en phase S (Funk *et al.*, 1991). Cette protéine induit également l'expression de métalloprotéases comme la gélatinase et la collagénase permettant ainsi un remodelage de la MEC.

L'apolipoprotéine J est induite par de nombreux stress et sa surexpression pourrait être liée à la survie cellulaire durant la sénescence répllicative et après un stress oxydatif (Dumont *et al.*, 2002).

Le gène SM22 (Smooth muscle 22) encode aussi pour une protéine liant le calcium. SM22 est une protéine de 22 Kda abondante dans les cellules musculaires lisses qui s'associent physiquement aux boursofflures de filaments d'actine des cellules musculaires lisses contractiles. Elle interviendrait donc dans le remodelage du cytosquelette.

## **V. Sénescence prématurée des fibroblastes IMR-90 induite par une exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Le type cellulaire utilisé au cours de ce mémoire a été développé au laboratoire. Il s'agit de fibroblastes de poumon fœtal humain féminin caucasien, de souche IMR-90. L'embryon était à sa 16<sup>ème</sup> semaine de gestation. Ces fibroblastes ont été prélevés en 1961 par Hayflick et Moorhead. Ils sont conservés à l'« American Type Culture Collection ». Les fibroblastes IMR-90 sont capables de réaliser environ 60 passages en culture avant l'apparition de la sénescence répllicative (Nichols *et al.*, 1977).

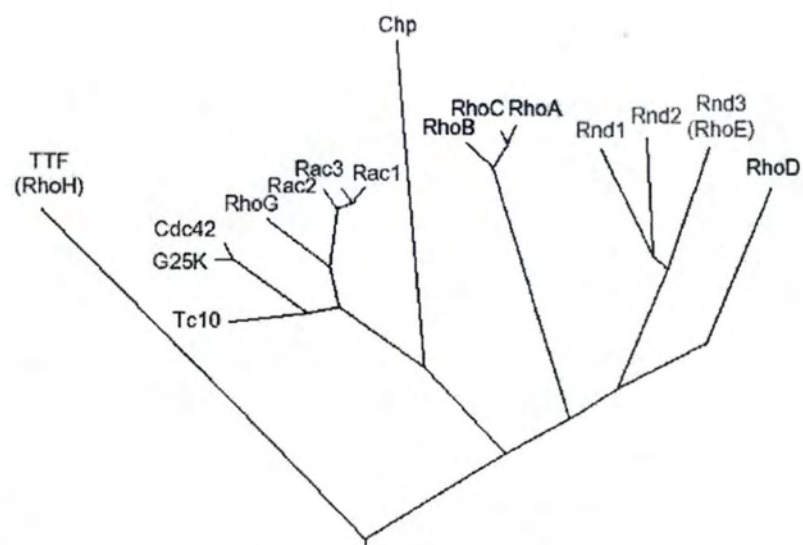
Lorsque ces cellules sont exposées à un stress oxydatif subcytotoxique unique de 2 heures sous peroxyde d'hydrogène à 150 µM, elles présentent les marqueurs de la sénescence à 72h après le stress.

Il existe un modèle intégratif basé sur des arguments expérimentaux permettant d'expliquer partiellement l'induction de la SIPS après exposition des fibroblastes IMR-90 à une dose sublétales sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**figure I.6**). Selon ce modèle, la protéine p38<sup>MAPK</sup> est phosphorylée dès les premières minutes après le début du stress sublétales sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et reste phosphorylée pendant au moins 72 heures après ce stress. Une boucle de rétroaction se met en place: l'activation en cascade de p38<sup>MAPK</sup> et du facteur de transcription ATF-2 est responsable d'une augmentation du taux de transcrits et de sécrétion du Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1). Celui-ci se lie à son récepteur de type II. Le récepteur de type I est alors activé par phosphorylation. Ceci maintient l'activation de p38<sup>MAPK</sup>, ce qui induit alors partiellement l'apparition de plusieurs marqueurs de la SIPS cités plus haut. Vingt-quatre heures après le stress subcytotoxique, la protéine pRb est totalement déphosphorylée et interagit avec ATF-2 phosphorylé (Frippiat *et al.*, 2002).

La diminution de l'activité de la CDK2 72 heures après le stress semble expliquer en partie l'accumulation de pRb hypophosphorylé (Toussaint *et al.*, 2003).

Une seconde boucle de rétroaction positive induirait la sécrétion d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la cellule sous le contrôle du TGF-β1. En effet, Thannickal et ses collaborateurs ont montré qu'il y avait une génération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la NADH oxydase. Cette oxydase serait activée par le TGF-β1 (Thannickal *et al.*, 1995).





**Figure I.7 :** Dendrogramme des 15 membres connus appartenant à la sous-famille des Rho GTPases (Ellis *et al.*, 2000).

Cependant, le TGF- $\beta$ 1 ne semble pas être le seul effecteur impliqué dans l'établissement de la SIPS. En effet, en présence d'anticorps neutralisants le TGF- $\beta$ 1 ou son récepteur de type II, l' $H_2O_2$  induit toujours un blocage du cycle cellulaire. Afin de découvrir d'autres effecteurs potentiels, une étude protéomique réalisée au laboratoire a révélé la néosynthèse d'une protéine régulant négativement Cdc42 et Rac1 : la GAP-Cdc42/Rac1. Elle augmente entre 48 et 72 heures après un stress subléthal sous  $H_2O_2$  chez des fibroblastes IMR-90. Cette néosynthèse semble être indépendante du TGF- $\beta$ 1. La suite de l'étude a révélé que Rac1 et Cdc42, deux petites protéines G, sont activées essentiellement 24 heures après le stress. Pour comprendre le rôle éventuel de ces protéines dans la SIPS, décrivons tout d'abord ce que sont les petites protéines G.

## VI. RAC-1

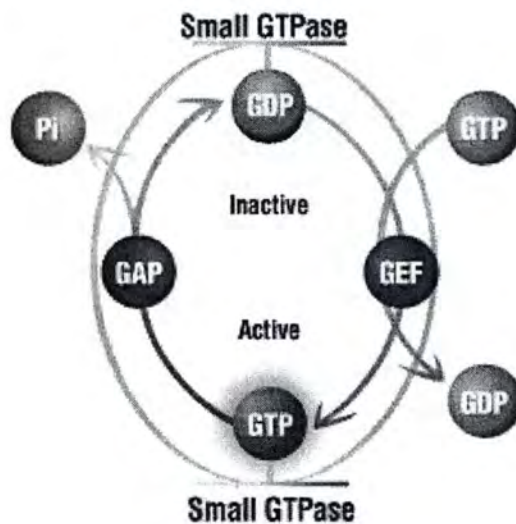
### VI.1 Introduction

La superfamille des petites protéines G est constituée de cinq familles, chacune associée à des fonctions spécifiques. Les protéines Ras jouent un rôle dans la prolifération cellulaire. Les protéines Rho sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette. Les protéines Ran régulent le transport nucléaire alors que les protéines Rab contrôlent le trafic vésiculaire. Les protéines Arf quant à elles sont importantes pour le trafic membranaire. Toutes ces protéines possèdent une activité GTPase intrinsèque. En effet, elles sont capables de lier le GTP et de l'hydrolyser en GDP et phosphate. La liaison du magnésium est nécessaire à l'hydrolyse du GTP. Les protéines G sont actives sous forme liée au GTP. Les petites protéines G sont hétérotrimériques et font environ 20 kDA (Ridley, 1997).

La famille des protéines Rho comprend les protéines Rac, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, Cdc42, TC10 et TTF (**figure I.7**). Les Rho GTPases font le lien entre un signal extracellulaire et la transmission de l'information au sein de la cellule. Il existe une grande diversité de récepteurs membranaires et de régulateurs en amont des GTPases. Des signaux extracellulaires distincts, par exemple l'acide lysophosphatidique (LPA), la bombésine et la bradykinine activent respectivement Rho, Rac et Cdc42 à travers des récepteurs spécifiques comme les récepteurs aux tyrosines kinases (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (GPC).

La diversité des cibles des protéines Rho est également importante. Ainsi, quelques cibles potentielles des Rho-GTPases ont été identifiées comme par exemple les protéines kinases ou des protéines adaptatrices. De plus l'activation de Cdc42 peut induire celle de Rac-1 et cette dernière peut mener à l'activation de Rho. Les Rho GTPases peuvent donc agir en cascade (Chant et Stowers, 1995). Les fonctions des protéines Rho sont multiples, elles régulent l'organisation du cytosquelette d'actine, sont impliquées dans le trafic membranaire, dans la régulation transcriptomique, dans la croissance cellulaire et dans le développement (pour une revue Bar-Sagi *et al.*, 2000).

Il existe trois isoformes de la protéine Rac : Rac 1, 2 et 3. Elles ont des séquences très similaires. Rac-1 est exprimée de manière ubiquitaire. Rac-2 est exprimé dans des cellules d'origine hématopoïétique. Rac-3 est fortement exprimée au niveau du cerveau (Haataja *et al.*, 1997).



**Figure I.8 :** Représentation schématique du cycle des GTPases. En conditions inactives, les GTPases sont liées au GDP. Suite à une stimulation, les GTPases vont céder le GDP et lier le GTP. Cette réaction est catalysée par les GEFs. Cet état leur permet d'activer une série de voies situées en aval. L'activité des GTPases est transitoire, le GTP va être hydrolysé en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la protéine. L'hydrolyse est de plus catalysée par les GAPs (<http://www.piercenet.com>).



## VI.2 Régulation des GTPases

Les GTPases existent sous deux états conformationnels. La forme liée au GTP étant active alors que la forme liée au GDP est inactive. Seule la forme active est capable de fixer les protéines appelées effecteurs. Le passage entre ces deux états est extrêmement bien régulé et se fait par des voies différentes (le cycle des GTPases). La séparation entre ces deux états et leurs propriétés très différentes en font de véritables « interrupteurs » dans les voies de signalisation intracellulaires.

Il existe trois modulateurs du cycle des protéines G :

- GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factor): ces protéines favorisent la libération du GDP et donc facilitent l'activation des protéines G. On parle de facteurs activateurs. Trente de ces facteurs ont pu être identifiés. Tous les GEF des protéines Rho possèdent un domaine DH (Dbl Homology) qui permet l'activité catalytique, un domaine PH (Pleckstrine Homology) permet la liaison aux lipides (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PI(4,5)P<sub>2</sub>) et donc la localisation membranaire de la protéine. C'est avec ce domaine que la sous-unité  $\beta$  de la protéine G est liée. Le domaine PH pourrait également promouvoir l'activité du domaine DH. Chaque GEF possède des domaines additionnels spécifiques qui déterminent sa localisation subcellulaire et ces mécanismes d'activation. Les protéines Trio, Vav, Tiah-1, Sos-1 et SWAP-70 sont connues comme étant des GEFs spécifiques de Rac-1.
- GAP (GTPase Activating Protein) : il s'agit de GTPases qui catalysent la réaction d'hydrolyse du GDP et donc l'inhibition de la protéine G. L'activité GTPasique intrinsèque des GTPases est en effet très faible. À ce jour, environ 20 GAPs ont été identifiées. La chimerine, P67PHOX et RALBP1 sont des GAPs de Rac-1.
- GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) : sont des protéines qui permettent la séquestration de la protéine G liée au GDP. Elles réalisent donc un rôle inhibiteur (pour une revue Bishop *et al.*, 2000) (**figure I.8**).

## VI.3 Effecteurs des Rho GTPases

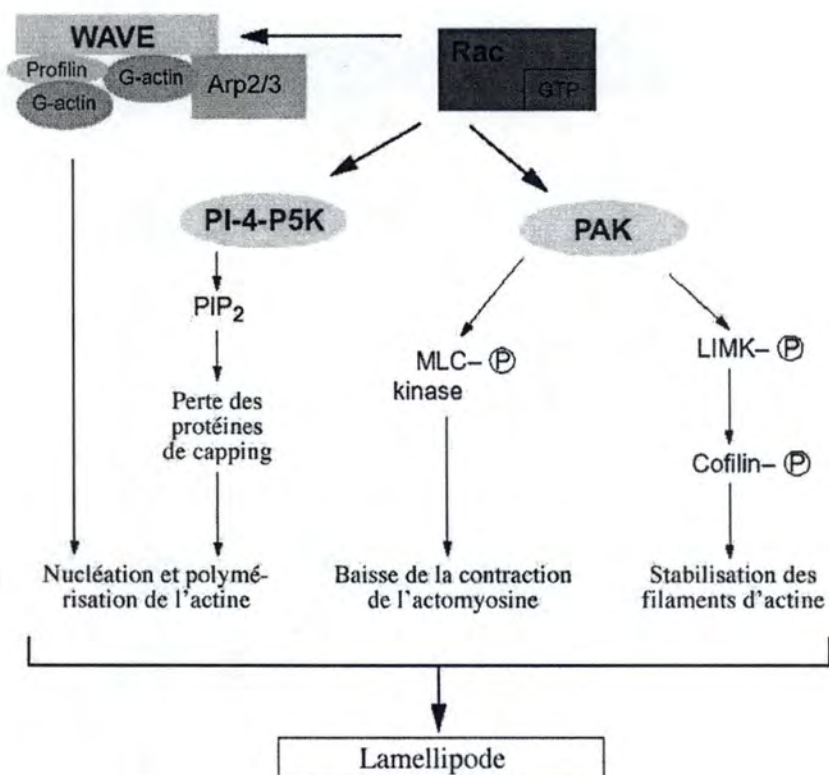
La liste des protéines avec lesquelles les membres de la famille des protéines Rho interagissent est longue (**tableau 3**). Certaines de ces protéines cibles participent à l'organisation du cytosquelette d'actine. Certaines de ces protéines sont actuellement sans fonction connue. L'attribution des effecteurs à certaines fonctions et certaines GTPases est complexe. En effet, il existe de nombreuses interactions protéiques possibles. Un effecteur peut être activé par plusieurs GTPases. Par exemple, la sérine/thréonine kinase PAK1 (p21-activated kinase 1) est activée par Cdc42 et Rac-1 alors que Rac-1 et Rho interagissent avec PI-4-5K.

Davantage de complexité est ajoutée par la communication entre les effecteurs. Un exemple typique de ceci est la régulation directe par Cdc42 et Rac-1 de phosphoinositide-3 kinase (PI-3K) et de son effecteur p70S6K. Les protéines reprises dans le **tableau 3** interagissent spécifiquement avec la forme active de l'une ou l'autre GTPase. Selon que la GTPase lie le GTP ou le GDP, la protéine change de conformation, essentiellement au niveau de deux boucles situées en surface de la protéine (switch I et II). Ce sont ces régions qui permettent aux effecteurs de discriminer la forme liée au GTP de celle liée au GDP.

Effecteur potentiel des protéines	Type de protéines	Fonctions	Liaison spécifique aux Rho GTPases		
ROK $\alpha$ , ROK $\beta$	Ser/Thr kinase	Actine/myosine	Rho		
PKN/ PRK1, PRK2	Ser/Thr kinase	Unconnu	Rho		
Citron kinase (citron)		Cytokynèse	Rho		
p70 S6 kinase	Ser/Thr kinase	Régulation de la traduction		Rac	Cdc42?
Mlk2, 3	Ser/Thr kinase	JNK		Rac	Cdc42
MEKK1, 4	Ser/Thr kinase	JNK		Rac	Cdc42
PAK1, 2, 3	Ser/Thr kinase	JNK/actine		Rac	Cdc42
PAK4	Ser/Thr kinase	Actine			Cdc42
MRCK $\alpha$ , MRCK $\beta$	Ser/Thr kinase	Actine			Cdc42
Ack1, 2	Tyr kinase	Unconnu			Cdc42
MBS	Sous-unité phosphatase	Inactivation de MLC	Rho		
PI-4-P5K	Lipide kinase	PIP <sub>2</sub> niveaux/actine	Rho*	Rac*	
PI3K	Lipide kinase	Niveaux de PIP <sub>3</sub>		Rac	Cdc42
DAG kinase	Lipide kinase	Niveaux de PA	Rho <sup>+</sup>	Rac*	
PLD	Lipase	Niveaux de PA	Rho	Rac	Cdc42
PLC- $\beta$ 2	Lipase	Niveaux de DAG/IP <sub>3</sub>		Rac	Cdc42
Rhophiline	Scaffold	Unconnu	Rho		
Rhotekine	Scaffold	Unconnu	Rho		
Kinctine	Scaffold	Liaison à la kinesine	Rho		
Dia1, Dia2	Scaffold	Organisation de l'actine	Rho		
WASP, N-WASP	Scaffold	Organisation de l'actine			Cdc42
WAVE/ Scar	Scaffold	Organisation de l'actine		Rac*	
POSH	Scaffold	Unconnu		Rac	
POR-1	Scaffold	Organisation de l'actine		Rac	
p140Sra-1	Scaffold	Organisation de l'actine		Rac	
p67 <sup>phox</sup>	Scaffold	NADPH oxydase		Rac	
MSE55, BORGs	Scaffold	Unconnu			Cdc42
IQGAP1,2	Scaffold	Actine/contactes cellules-cellules		Rac	Cdc42
CIP-4	Scaffold	Unconnu			Cdc42

**Tableau 1.2 :** Tableau reprenant les effecteurs des protéines G, le type de protéine, leurs fonctions ainsi que les Rho GTPases avec lesquelles elles interagissent spécifiquement. Les protéines annotées d'une astérisque semblent activées par les GTPases liées au GTP mais dont l'interaction est indépendante du GTP. Les protéines annotées d'un signe + semblent régulées par les GTPases mais dont l'interaction n'a pas encore été montrée. Abréviation : PKN, protein kinase N; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; IP<sub>3</sub>, inositol trisphosphate; PA, phosphatidic acid. (Bishop et Hall, 2000).





**Figure I.9 :** Schéma représentant les différentes voies activées par Rac-1 et menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine en lamellipodes (Bishop *et al.*, 2000).

## **VI.4 Les Rho GTPases et le cytosquelette d'actine**

Le cytosquelette d'actine joue plusieurs rôles importants dans la cellule. Il est responsable de la morphologie cellulaire et de nombreux aspects dynamiques tels que la migration cellulaire, la guidance du cône de croissance cellulaire, la phagocytose et la cytokinèse. La migration cellulaire est importante tant durant le développement embryonnaire que durant une réponse inflammatoire ou lors de la métastase tumorale.

Les Rho GTPases jouent un rôle dans la formation du cytosquelette d'actine notamment en régulant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Les protéines Rho induisent la formation des fibres de stress d'actine et des plaques d'adhésion focales dans les fibroblastes et dans d'autres types de cellules adhérentes (Machesky *et al.*, 1996). Les plaques d'adhésion focales sont des sites d'agglutinations d'intégrines faisant la jonction entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Elles sont le point de départ de cascade de transduction du signal où les intégrines recrutent la taline et la paxilline au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines interagissent avec la kinase des adhésions focales (FAK), ce qui conduit à son autophosphorylation. Src est recrutée à son tour et phosphorylée, notamment sur des résidus tyrosines. Des protéines à domaine SH2 (GRB2) sont à leur tour activées. Il a été montré que Rho stimule la phosphorylation de la paxilline et de FAK sur des résidus tyrosines (Burrige et Chrzanowska, 1996).

Rac-1 est responsable de la formation des lamellipodes, les feuilletts membranaires qui résultent d'une polymérisation ramifiée de filaments d'actine. Les lamellipodes permettent à la cellule de s'allonger dans une direction donnée, ce qui permet la migration cellulaire ou la prise de proies (chez les amibes et les cellules phagocytaires du système immunitaire comme les macrophages). Dans le cas de la migration cellulaire, les microfilaments d'actine se lient à des plaques d'adhésion focales qui servent de points d'appui sur la matrice extracellulaire. Des analyses réalisées sur des macrophages, des cellules épithéliales et des fibroblastes montrent que l'inhibition de Rac-1 empêche le mouvement des cellules (Ridley *et al.*, 1995 ; Allen *et al.*, 1998 ; Nobes *et al.*, 1999). Rac-1 est aussi requise pour la migration induite par le PDGF (Platelet derived Growth Factor).

La formation des lamellipodes induite par Rac-1 résulteraient d'une cascade de transduction du signal. Rac-1 agit sur plusieurs cibles notamment PAK1, PI(4)P 5K et IRSp53 (**figure I.9**).

- Les PAKs agissent sur deux protéines ; premièrement, elles régulent directement la mobilité cellulaire en phosphorylant la chaîne légère de la myosine (MLC). Deuxièmement, les PAKs activent la LIM Kinase (LIMK) par phosphorylation. La LIMK a un effet inhibiteur sur la cofiline. Cette dernière protéine stimule la dépolymérisation de l'actine. Son inhibition permet donc de stabiliser et d'augmenter la quantité d'actine polymérisée.
- PI(4)P 5K est une kinase responsable de la génération de PI(4,5)P<sub>2</sub>, un lipide qui possède de nombreuses fonctions. L'augmentation de la concentration en PI(4,5)P<sub>2</sub> intracellulaire est indispensable pour « décoiffer » les filaments d'actine. Or, le « décoiffage » de l'actine est nécessaire pour que ces filaments puissent s'assembler.
- Une autre voie de modulation des filaments d'actine induite par Rac-1 fait intervenir les protéines WAVE, dont trois isoformes ont été décrites chez les mammifères. Ces protéines sont très proches des protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein). Il existe un lien indirect entre Rac-1 et WAVE qui nécessite la présence du complexe Arp2/3 et de la protéine IRSp53 (Miki *et al.*, 2000).

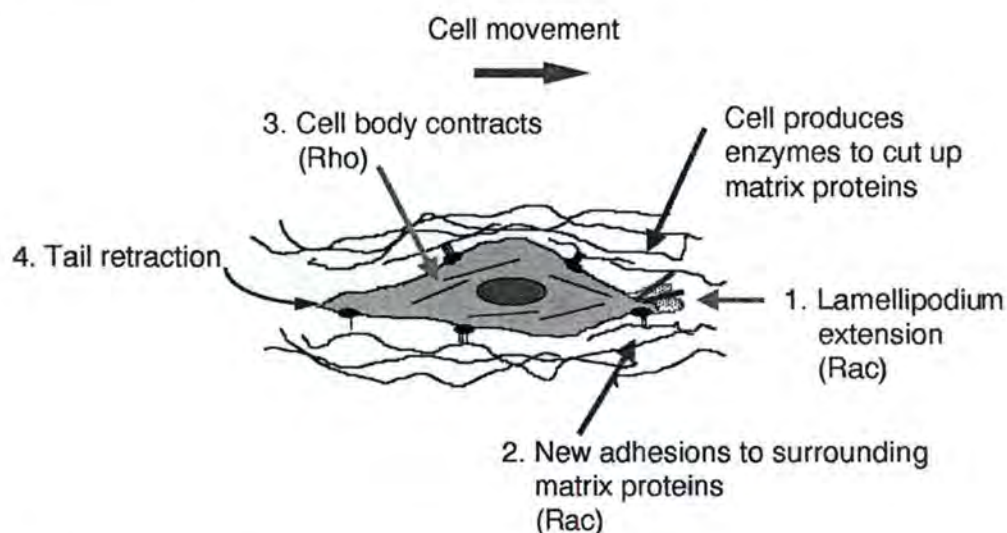


Ces trois voies conduisent à la stabilisation, la nucléation et à la polymérisation des filaments d'actine ainsi qu'à la diminution de la contraction de l'actomyosine. Ceci permet la formation des lamellipodes et des feuilletts membranaires. D'autres protéines sont également impliquées dans cette formation comme par exemple: POR-1 (Partenaire de RAC) (Bischof *et al.*, 2000).

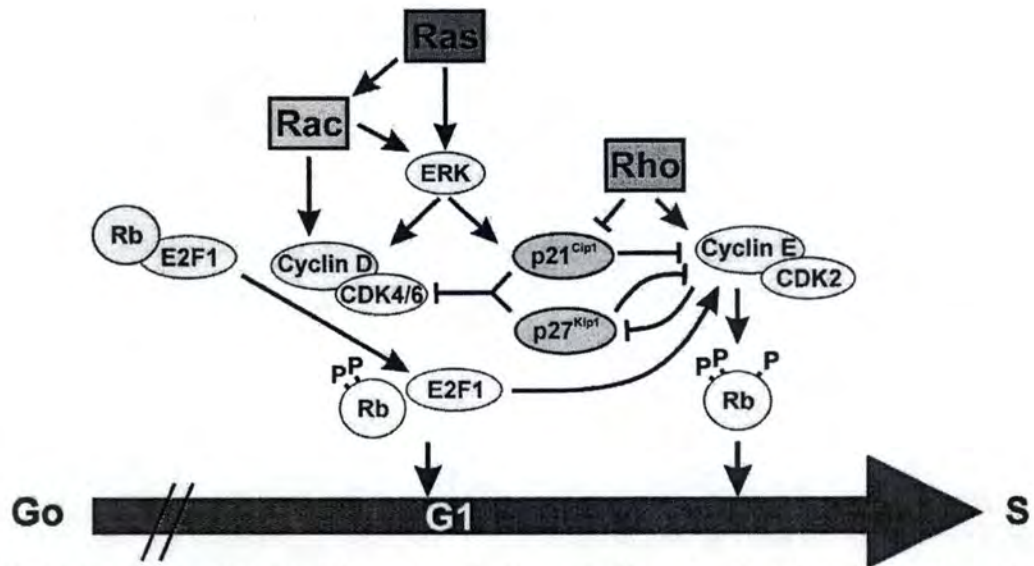
Cdc42 est nécessaire au contrôle de la direction du mouvement et est à l'origine de la formation des filopodes.

Ras quant à elle semble jouer un rôle dans le renouvellement des plaques d'adhésion focales. En effet, en absence de ces structures adhésives, les cellules n'ont pas besoin de Ras pour se mouvoir. La formation des plaques d'adhésion focales étant contrôlée par Rho, Ras pourrait jouer le rôle de régulateur négatif. Ras mène à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine via la cascade de transduction du signal : ERK MAP kinase (extracellular signal regulated kinase). La contraction des filaments d'acto-myosine augmente. Il y a une contraction de l'arrière de la cellule (Bar-Sagi *et al.*, 2000).

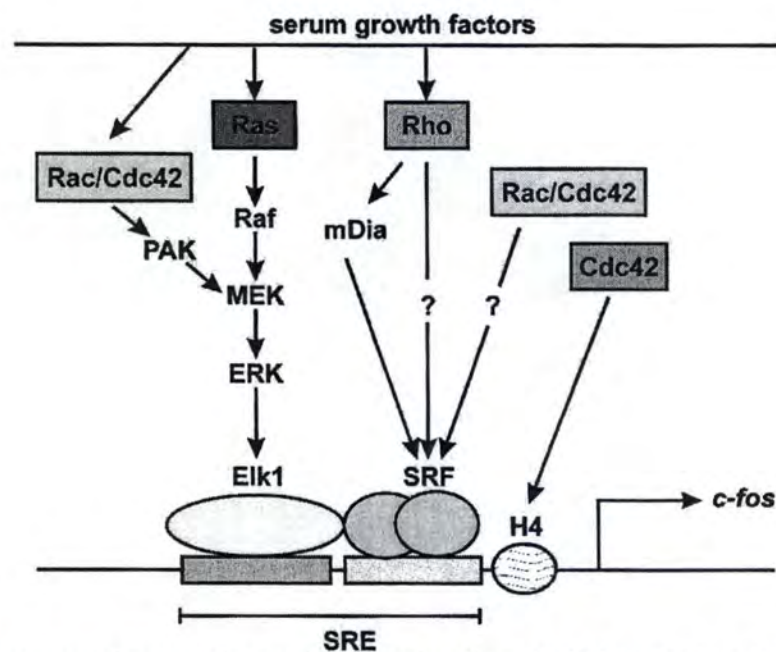
La migration cellulaire nécessite une coordination importante entre les différentes GTPases (**figure I.10**). Schématiquement, on peut penser que Rac-1 agit comme le moteur cellulaire en formant les lamellipodes, que Rho contrôle l'assemblage des câbles d'actine ainsi que la formation des plaques d'adhésion, alors que Cdc42 contrôle la formation des filopodes et donc la direction de la migration. Ras permet quant à lui de défaire les plaques d'adhésion focales et d'entraîner la cellule vers l'avant. Les différentes GTPases sont reliées entre elles et hiérarchisées : Cdc42 conduit à l'activation de Rac1 qui elle même entraîne celle de Rho.



**Figure I.10 : Schéma représentant les différentes étapes de la migration cellulaire.** Une cellule en migration étend des lamellipodes à l'avant de la cellule. Ces prolongements sont stabilisés par la formation de plaques d'adhésion focales (Rac1). Le corps de la cellule avance grâce à la contraction de l'acto-myosine (Rho). La queue de la cellule se détache du substrat et se rétracte (Ras). Les cellules de migration sécrètent également des protéases qui coupent les protéines de la matrice (Ridley, 2001).



**Figure I.11 :** Schéma représentant les voies de transduction du signal sous l'influence des protéines Ras et Rho impliquées dans la progression du cycle cellulaire vers la phase S (Bar-Sagi *et al.*, 2000).



**Figure I.12 :** Schéma représentant les voies d'activation de SRF par les Rho GTPases et menant à la transcription de *c-fos*. Ces protéines Rho agissent de manière complémentaire dans cette voie (Bar-Sagi *et al.*, 2000).



## **VI.5 Rôle des GTPases dans la progression du cycle cellulaire et la régulation transcriptomique**

Les protéines Rho, Rac1 et Cdc42 sont requises pour la progression vers la phase S du cycle cellulaire des fibroblastes (Olson *et al.*, 1995). Un des mécanismes par lequel la famille des protéines Rho peut réguler la progression du cycle cellulaire est l'activation de facteurs de transcription. Les trois Rho GTPases sont, par exemple, capables d'activer NF- $\kappa$ B (Perona *et al.*, 1997). Dans les fibroblastes embryonnaires de rats, l'expression constitutive de Rac1 et Raf activé est suffisante pour stimuler la transition entre les phases G1 et S (Joneson *et al.*, 1998). Rac1 active permet d'induire l'accumulation de la cycline D1 par deux mécanismes. Premièrement, la stimulation de la transactivation du promoteur de la cycline D1 passe par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Deuxièmement, la collaboration entre Rac1 et la cascade des ERK induit l'expression de la cycline D1. Ces deux mécanismes permettraient d'atteindre un niveau d'expression suffisant de la cycline D1. Il a été montré que Rho supprime l'induction de p21<sup>Cip1</sup> permettant de ce fait à Ras de stimuler la progression de cycle de cellulaire (Olson *et al.*, 1998). Cependant, les voies de signalisation utilisées par Rho pour empêcher l'induction de p21<sup>Cip1</sup> sont toujours inconnues. Un autre point de régulation de la progression du cycle de cellulaire par Rho est l'induction de la dégradation de p27<sup>Kip1</sup> un inhibiteur de CDK par la stimulation de l'activité du cyclin E/CDK2 (Hu *et al.*, 1999) (**figure I.11**).

SRF (Serum Responsive Factor) est une autre cible régulée par les Rho GTPases. Beaucoup de gènes de réponse rapide aux stimulations mitogéniques possèdent dans leur promoteur une région conservée appelée l'élément de réponse au sérum (SRE). Celui-ci est activé par un facteur de transcription ubiquitaire : SRF. L'élément de réponse au sérum de *c-fos* peut être activé par l'action coordonnée de Ras, Rac-1 et Cdc42. SRF est activé par un effecteur de Rho qui est mDia (Hill *et al.*, 1995). Elk1 est activé par la voie de transduction du signal Ras/Raf/MEK/ERK, il peut alors former un complexe trimérique actif avec SFR. Rac-1 et Cdc42 régulent aussi Elk1 et activent PAK qui va activer MEK. Cdc42 est également responsable de l'hyperacétylation de l'histone H4 (**figure I.12**).

L'induction de *c-fos* par les GTPases est particulièrement intéressante puisque Cdc42 et Rac1 peuvent également activer JNK (Jun N-terminal Kinase) (Coso *et al.*, 1995). JNK phosphoryle et active c-Jun. c-Jun peut alors former un dimère avec c-Fos pour former le complexe AP-1. Ce dernier est impliqué dans la réponse médiée par les intégrines de plusieurs systèmes.

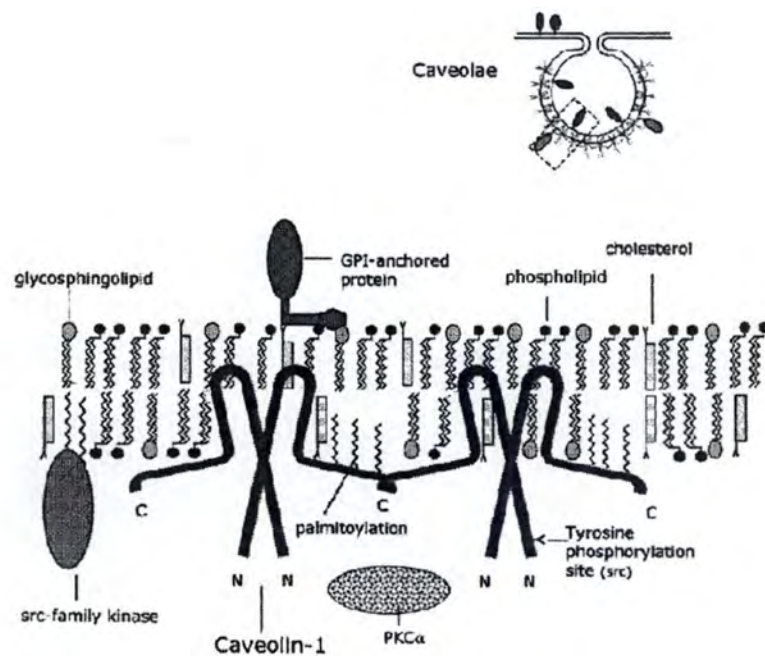
## **VII. La cavéoline**

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'activation après stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de Rac1 et Cdc42. La cavéoline-1 pourrait par exemple jouer un rôle dans cette activation. En effet, la relation entre Rac1/Cdc42 et la cavéoline-1 a déjà fait l'objet d'études ultérieures.

### **VII.1 Introduction**

#### **VII.1.1 Les cavéoles**

Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre et constituées entre autre par une protéine : la cavéoline. Les cavéoles ont été décrites pour la première fois dans les années 1950 par G. Pallade et E. Yamada. Les cavéoles se retrouvent aussi bien au niveau des cellules endothéliales, des adipocytes, des



**Figure I.13:** Représentation schématique d'une cavéole. La cavéoline-1 (noir) s'insère en boucle dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Elle possède une région hydrophobe comprenant 3 ancras palmitoyls, un domaine « scaffolding » qui permet l'oligomérisation. Ce domaine interagit également avec d'autres protéines comme par exemple src et la PKC. La région N-terminale forme des interactions avec la filamine (Bender *et al.*, 2002).



cellules musculaires que des fibroblastes. Les cavéoles sont formées dans des régions particulières appelées « lipid raft » ou radeaux lipidiques. Ces régions sont riches en cholestérol, sphingomyéline, glycosphingolipides, protéines à ancras GPI ou Palmitoyl et cavéolines (**figure I.13**). Les cavéoles assurent différentes fonctions dont celles de transport et de modulation de la transduction du signal. Les cavéoles sont des « plates-formes » de signalisation en membrane plasmique où les différents partenaires sont rassemblés, ce qui leur permet d'interagir entre eux (pour une revue : Quest *et al.*, 2004).

### VII.1.2 La cavéoline

La cavéoline est une protéine intégrale membranaire de 21-24 kDa. Elle s'insère en boucle dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Les régions N- et C-terminale se situent dans le cytoplasme. Une région hydrophobe comprenant 3 ancras palmitoyls permet l'ancrage membranaire. La cavéoline-1 possède, au niveau de la région N-terminale, un domaine « scaffolding » par lequel la cavéoline interagit avec la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G, avec H-Ras, Neu, les tyrosines kinases de la famille Src, l'isoforme C de la protéine kinase, le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor), la eNOS (endothelial nitric oxyde synthase), etc. Le domaine « scaffolding » et le domaine C-terminal de la cavéoline sont impliqués dans la régulation négative de différentes voies de transduction du signal (Ju *et al.*, 1997 ; Engelman *et al.*, 1998 et Razani *et al.*, 1999). Les gènes de la famille des cavéolines sont structurellement et fonctionnellement conservés depuis *C. elegans* jusqu'à l'homme (Tang *et al.*, 1997), soutenant l'idée de l'importance du rôle de la cavéoline.

Il existe trois formes de cavéolines. La cavéoline-1, -2 et 3. Les deux premières étant ubiquitaires et coexprimées. Elles peuvent former des hétéro-oligomères. La cavéoline-1 peut former des homo-oligomères par association de 14 à 16 sous-unités au niveau du réticulum endoplasmique. La cavéoline-3 est spécifique des cellules musculaires où elle jouerait un rôle similaire aux tubules-T. Elle se retrouve à la fois au niveau des cellules musculaires striées cardiaques ou squelettiques qu'au niveau des cellules musculaires lisses.

L'internalisation des radeaux lipidiques est médiée par la dynamine-2 et la cavéoline-1. Cette internalisation nécessite la phosphorylation de la cavéoline-1 sur sa Tyrosine 14 et le détachement des cellules de leur substrat. La cavéoline-1 phosphorylée est libérée des plaques d'adhésion focales et migre vers les cavéoles. Ce changement de localisation induit l'internalisation des « lipid rafts ». La cavéoline-1 joue un rôle dans l'inhibition de la croissance cellulaire (del Pozo *et al.*, 2005).

Le gène de la cavéoline-1 est localisé au niveau d'un locus suppresseur de tumeur. Le niveau relatif des transcrits et de protéine de la cavéoline-1 diminue dans les cellules transformées suite à l'activation d'oncogène tel que v-Abl et H-Ras (G12V). Les cavéoles sont absentes dans ces cellules (Koleske *et al.*, 1995). L'absence d'expression de la cavéoline a également été montrée dans plusieurs lignées de cellules transformées dérivées d'un carcinome mammaire humain (MT-1, MCF-7, ZR-75-1, etc) (Sager *et al.*, 1994). En effet, il semble que la cavéoline soit mutée dans 60% des cancers du sein. Suite à un stimulus carcinogénique, la fréquence d'apparition de tumeurs est plus élevée pour des souris déficientes pour la cavéoline-1. De plus des fibroblastes NIH 3T3 exprimant l'ARN anti-sens dirigé contre le transcrit de la cavéoline se transforment et activent de manière constitutive la cascade de kinases mitogènes p42/44 (Engelman *et al.*, 1998).



## VII.2 Cavéoline, sénescence répllicative et SIPS

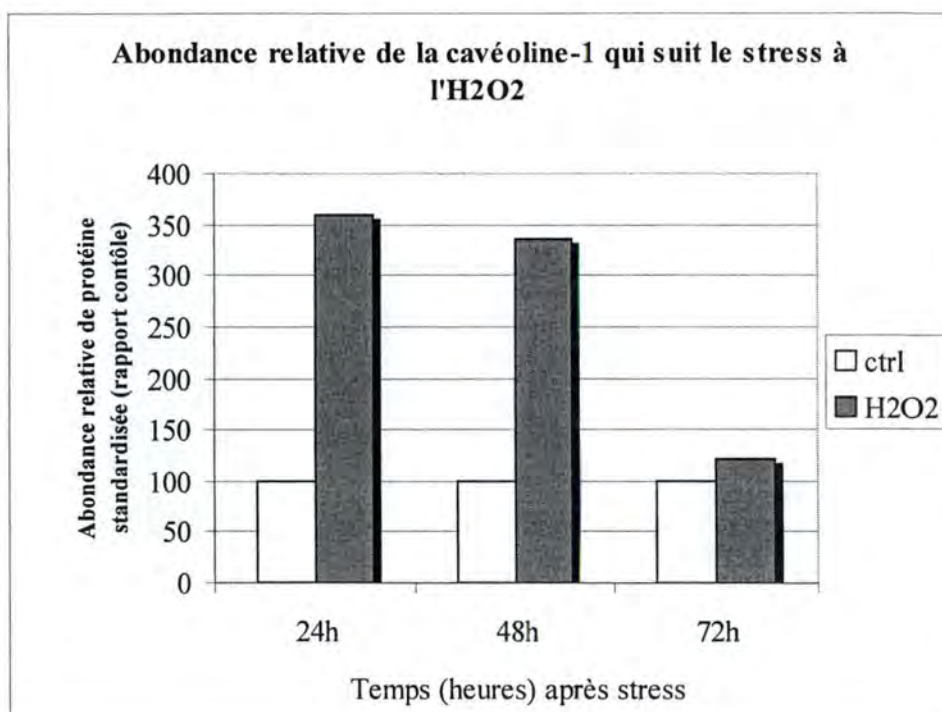
Chez les fibroblastes NIH3T3, la cavéoline semble jouer un rôle dans la sénescence induite prématurément par un stress subléthal au peroxyde d'hydrogène. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de la cavéoline et de l'activité de son promoteur dans ces cellules. Ces mêmes fibroblastes soumis aux ultraviolets présentent également une augmentation de l'expression du gène de la cavéoline-1 (Volonte *et al.*, 2002).

La présence de quercétin ou la vitamine E durant l'exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prévient l'apparition de la SIPS ainsi que la transcription et l'augmentation de l'abondance de la cavéoline-1. L'étude de fibroblastes NIH 3T3 exprimant l'ARN anti-sens dirigé contre le transcrite de la cavéoline-1 a montré une diminution de la proportion de cellules en sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en se basant sur l'activité SA  $\beta$ -Gal comme critère de sénescence. Ces cellules semblent plus sujettes à l'apoptose suite à ce stress oxydatif que les NIH 3T3 exprimant la cavéoline-1. Ce type de stress oxydatif pourrait donc soit promouvoir la SIPS soit l'apoptose selon que la cavéoline-1 est respectivement exprimée ou non. La surexpression de la cavéoline-1 serait suffisante pour induire un phénotype sénescence dans ces cellules et l'augmentation de la cavéoline-1 semble être une étape importante dans l'établissement de la SIPS (Volonte *et al.*, 2002).

En vue d'étudier les changements morphologiques des fibroblastes sénescence, Cho et ses collaborateurs ont examiné des protéines régulatrices du cytosquelette telles que Rac1, RhoA et Cdc42, des intégrines et des protéines impliquées dans la formation des plaques d'adhésion focales. La relation entre ces protéines et la cavéoline-1 a également été étudiée. Ainsi, ils ont pu montrer que la cavéoline-1 est associée aux complexes d'adhésion focale par les intégrines et contrôle l'activité de la kinase des adhésions focales (FAK). Il y a une augmentation de la formation des fibres de stress d'actine et des plaques d'adhésions focales dans les cellules sénescence. L'abondance des molécules impliquées dans la formation des plaques d'adhésions focales tels que FAK et p-FAK, p-Paxilline et l'intégrine  $\beta$ 1 augmente dans les cavéoles des fibroblastes en sénescence répllicative. L'utilisation des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 dans les fibroblastes sénescence entraîne l'inactivation de FAK et donc la rupture des plaques d'adhésions focales et des fibres de stress d'actine. La diminution de l'abondance de la cavéoline-1 permettrait d'inverser les changements morphologiques induits lors de la sénescence. Les petites GTPases de la famille Rho agissent entre autres comme modulateurs du cytosquelette d'actine. L'activation de RhoA conduit à la formation des plaques d'adhésions focales, de Rac1 des fibres de stress d'actine et des lamellipodes et de Cdc42 des filopodes (voir paragraphe VI.4). Cho a pu montrer que Rac1 et Cdc42 sont activés dans les fibroblastes sénescence et sont responsables de changements morphologiques dans les cellules sénescence. De plus, Rac1 et Cdc42 interagissent directement avec la cavéoline-1 et voient leur activité augmenter dans les cavéoles. La cavéoline-1 pourrait être impliquée dans l'activation de Rac1 et Cdc42 durant le vieillissement cellulaire (Cho *et al.*, 2004).

Au laboratoire, il a été démontré que des fibroblastes IMR-90 soumis à un stress subléthal à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présentent une augmentation significative de l'abondance de la cavéoline-1 essentiellement 24 heures après le stress (**figure I.14**). De plus, il n'a pas été observé de variation de niveau relatif de transcrits au cours du temps qui suit ce stress.





**Figure I.14 :** Quantification des différentes bandes obtenue par Western-Blot montrant le niveau relatif d'expression protéique de la cavéoline-1 pour des fibroblastes IMR-90 dans deux conditions étudiées (fibroblastes contrôles et fibroblastes stressés à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 24, 48 et 72h après le stress.

Les valeurs obtenues pour la cavéoline-1 ont été normalisées par celle obtenues pour l' $\alpha$ -tubuline. Les abondances relatives de la cavéoline-1 ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

# But du mémoire



## **Deuxième partie : But du mémoire**

La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) est caractérisée par de nombreux marqueurs de la sénescence répliative. Comme des modifications morphologiques typiques, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -Gal), un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 /S, une altération du génome mitochondrial, une modification de l'expression génique, etc. Un modèle de SIPS mis au point au laboratoire consiste à exposer les fibroblastes humains de souche IMR-90 à une concentration sublétalement en  $H_2O_2$  pendant deux heures (Fripiat *et al.*, 2001 et 2002).

Une étude réalisée au laboratoire a révélé que Rac1 est activée essentiellement 24 heures après le stress sublétalement d' $H_2O_2$ . Un candidat potentiel responsable de l'activation de Rac1 dans la SIPS induite par l' $H_2O_2$  est la cavéoline-1. En effet, la relation Rac1 avec la cavéoline-1 a déjà fait l'objet d'études dans d'autres laboratoires.

Au cours de ce mémoire, nous allons donc nous intéresser à l'expression la cavéoline-1 lors d'un stress à l' $H_2O_2$  induisant la SIPS chez les fibroblastes IMR-90. Nous allons étudier son abondance relative ainsi que sa localisation subcellulaire. Ensuite nous utiliserons des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 afin de déterminer l'implication de celle-ci dans l'apparition de deux marqueurs de la SIPS (SA  $\beta$ -Gal et arrêt du cycle cellulaire). Enfin, nous étudierons l'implication de la cavéoline-1 sur l'activation de Rac1 après le stress à l' $H_2O_2$ .

Au terme de ce mémoire, nous espérons donc éclaircir l'implication de la cavéoline-1 dans l'établissement du phénotype de sénescence prématurée induite par un stress à l' $H_2O_2$ .

# Matériels et méthodes



## **Troisième partie : Matériels et méthodes**

### **I. Culture et stress sublétal des fibroblastes IMR-90**

#### **I.1 Culture cellulaire : Repiquage de fibroblastes IMR-90**

Les fibroblastes IMR-90, conservés à l'« American Type Culture Collection » (Manassas, USA), sont cultivés dans des boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> ou de 25 cm<sup>2</sup>. Le milieu utilisé est du MEM (Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont repiquées une fois qu'elles atteignent la confluence. Elles sont stressées lorsqu'elles sont à leur 27<sup>ème</sup> passage en culture.

##### **Matériel**

- MEM +AB : milieu MEM (Modified Eagle Medium) enrichi d'antibiotiques :
  - Amphotéricine-B : 0,25 µg/ml (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
  - Streptomycine sulfate : 100 µg/ml (Sigma, St Louis, USA).
  - Pénicilline : 100 U/ml (Sigma, St Louis, USA).
- MEM +AB+10% FBS : milieu MEM +AB additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne).
- Milieu de rinçage : PBS : tampon phosphate salin (10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)
- Trypsine : solution de trypsine à 0,25% dans un tampon tris (0,4g /KCl ; 2,2g /NaHCO<sub>3</sub> ; 6,8 g/NaCl ; 1,0 g/glucose ; 0,5 mg/rouge de phénol) (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne).
- Boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> et de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Cambridge, USA).
- Milieu de congélation : MEM additionné de 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et de 20% de FBS.

##### **Méthode**

Préchauffer à 37°C le PBS, le MEM+10% FBS et laisser décongeler la trypsine à température ambiante.

Décanner l'ancien milieu et rincer les cellules avec 10 ml de PBS, décanner.

Ajouter 500 µl de solution de trypsine par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> et laisser incubé à 37°C pendant environ 10 min, le temps que les cellules se détachent.

Ajouter 10 ml de MEM+AB+10%FBS par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>, récupérer les cellules et rompre les agrégats cellulaires à l'aide d'une pipette Pasteur.

Répartir les cellules en deux ou quatre boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> et ajouter du milieu MEM +AB+10% FBS pour obtenir un volume final de 13 ml.

Placer les cellules dans une étuve à 37°C sans CO<sub>2</sub>.

#### **I.2 Exposition des fibroblastes IMR-90 à un stress sublétal à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Afin d'induire la SIPS des fibroblastes IMR-90, un stress sublétal a été réalisé par incubation de ces cellules avec 150 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 2 h.

##### **Matériel**

- Solution de peroxyde d'hydrogène 30% (Merck, Germany)
- Milieu MEM +AB+10% FBS
- Milieu de rinçage: PBS

### Méthode

Diluer l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à une concentration de 150  $\mu\text{M}$  dans du milieu MEM +AB+10% FBS. l' $\text{H}_2\text{O}_2$  étant une molécule instable, cette solution est préparée juste avant le stress.

Décanner l'ancien milieu et ajouter 10 ml/boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  ou 5 ml/boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$  de milieu additionné d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Incuber les cellules durant 2 h dans une étuve à 37°C.

Rincer deux fois les cellules avec 10 ml de PBS par boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  ou 5ml de PBS par boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$ .

Placer 13 ml de MEM +AB+10% par boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  ou 5 ml par boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$ .

Placer les cellules dans une étuve à 37°C.

En parallèle, des boîtes de cellules contrôles sont soumises aux mêmes changements de milieu. Celui-ci ne contient pas d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## **II. Détection des marqueurs de la sénescence**

### **II.1. Activité SA $\beta$ -gal**

Nous avons réalisé une coloration histochimique des fibroblastes IMR-90 par utilisation du X-gal, un substrat artificiel de la  $\beta$ -galactosidase à 72 h après le stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , et ce pour les différentes conditions étudiées afin de détecter l'activité SA  $\beta$ -Gal.

### Matériel

- Solution de fixation: formaldéhyde 2% (Belgolabo, Belgique), glutaraldéhyde 0,2% (Fluka, Pays-Bas) , PBS
- Solution de coloration :
  - Tampon hydrogénophosphate de sodium 40 mM pH6 :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Allemagne),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Allemagne)
  - Ferrocyanure de potassium 5 mM (Merck, Allemagne)
  - Ferricyanure de potassium 5 mM (Merck, Allemagne)
  - NaCl 150 mM (Merck, Allemagne)
  - $\text{MgCl}_2$  2 mM (Merck, Allemagne)
  - Solution x-gal : 20 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (Eurogentec, Belgique) dilué dans du N,N diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique)
- Méthanol (Acros Organics, Belgique)
- Milieu de rinçage: PBS
- Plaque 6 puits stériles (Corning, USA)

### Méthode

Repiquer les cellules 24 h après le stress à une densité de 100 cellules/ $\text{cm}^2$  dans une plaque 6 puits

72 h après le stress, décanner le milieu de culture des cellules et les rincer 2x avec du PBS.

Fixer les cellules dans la solution de fixation pendant 5 min.

Rincer les cellules 2x avec du PBS.

Incuber les cellules dans la solution de coloration pendant 12 à 16 h à 37°C, sans  $\text{CO}_2$  et à l'abri de la lumière.

Quand la coloration est nette, rincer les cellules 2X avec du PBS, puis 2X avec du méthanol.

Laisser sécher les cellules à température ambiante.



A l'aide d'un microscope optique, compter la proportion de cellules présentant une activité SA  $\beta$ -gal (compter au minimum 400 cellules dans chaque puit).

## **II.2. Incorporation de la [ $^3\text{H}$ ]-thymidine**

La mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée par les fibroblastes IMR-90 permet d'estimer leur potentiel prolifératif entre 48 et 72h après le stress subléta ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), et ce pour les différentes conditions étudiées.

### **Matériel**

- NaOH 0,5 M (Merck, Allemagne)
- HCl 0,5 M (Merck, Allemagne)
- Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (SDS, France)
- Ethanol 70% (SDS, France)
- Milieu de rinçage: PBS
- Thymidine tritiée (NEN, Boston, USA)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)
- Plaque 24 puits stérile (Corning, USA)
- Compteur à scintillation (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, USA)

### **Méthode**

Repiquer les cellules 24 h après le stress à une confluence de 5000 cellules par  $\text{cm}^2$  dans une plaque 24 puits.

48 h après le stress incuber les cellules dans du milieu MEM+AB additionné de 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de thymidine tritiée.

Incuber les cellules 24 h dans une étuve à 5 %  $\text{CO}_2$ . Ceci permet aux cellules d'incorporer la thymidine tritiée. Décanter le milieu de culture et rincer les cellules 2X avec du PBS, 1x avec du TCA 10% (préalablement refroidi sur glace), 1x avec de l'éthanol 70 % et 1x avec du PBS. Ajouter 250  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,5 M et laisser incuber 30 min.

Neutraliser la réaction au moyen de 250  $\mu\text{l}$  d'HCl 0,5 M.

Après homogénéisation à la pipette Pasteur, reprendre le lysat cellulaire dans une fiole et y ajouter 5 ml d'Aqualuma. L'Aqualuma permet de convertir l'énergie présente dans l'émission de radioactivité du lysat cellulaire en énergie lumineuse. Agiter fortement la fiole et la placer dans le compteur à scintillation.

## **II.3. Dosage protéique par la méthode de Folin**

Le dosage protéique par la méthode de Folin est réalisé 48 h après le stress pour les différentes conditions. Celui-ci permet de rapporter les résultats obtenus d'incorporation de la thymidine tritiée par microgramme de protéines issues de fibroblastes IMR-90.

### **Matériel**

- Milieu de rinçage : PBS
- NaOH 0,5 N
- Solution de Folin: Stock à diluer 2 fois avec de l' $\text{H}_2\text{O}$  distillée (Merck, Allemagne)
- Eau distillée
- Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro)
- Etalon protéique: BSA (Bovine Serum Albumine) (PAA laboratories Gmgh) solution stock à 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

- Solution saline:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 %  
200  $\mu\text{l}$  de solution tartrate 0,02 %  
200  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  0,01 %

#### Méthode

24 h après le stress, repiquer les cellules à une confluence de 1000 cellules par  $\text{cm}^2$  dans une plaque 6 puits.

48 h après le stress, rincer les cellules 2X avec du PBS froid.

Ajouter 1 ml de NaOH 0,5 N pour lyser les cellules et incubé minimum 30 min à 4°C.

Mélanger vigoureusement l'extrait cellulaire.

Prélever 400  $\mu\text{l}$  du lysat et placer dans un tube de 3 ml.

Ajouter 2 ml de solution saline.

Après maximum 15 min ajouter 200  $\mu\text{l}$  de solution de Folin, agiter immédiatement.

Après 30 min, lire l'absorbance à 740 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Réaliser 1 blanc avec de l' $\text{H}_2\text{O}$ .

Réaliser une droite standard à l'aide d'une solution contenant 0, 50, 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$  de BSA dans du NaOH 0,5N.

La concentration en protéines des échantillons est calculée à partir de cette droite.

### **III. Western-Blotting**

#### **III.1. Extraction protéique**

##### Matériel

- PBS
- Racloir (TRP, Suisse)
- Tampon de lyse : Tris-HCl 25 mM pH7,5, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, NP-40 1%, DTT 1 mM et glycérol 5% (Pierce, USA)
- Inhibiteurs de protéases: PIC 40 $\mu\text{l/ml}$  de tampon (Roche, Allemagne)
- Microtubes

##### Méthode

Décanner l'ancien milieu

Rincer les cellules 2X avec du PBS froid (10 ml/boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$  ou 5 ml/boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$ ), décanter totalement.

Ajouter 150  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse par boîte de culture de 25  $\text{cm}^2$  ou 300  $\mu\text{l}$  par boîte de culture de 75  $\text{cm}^2$ .

Racler les cellules et transférer les lysats cellulaires dans un microtube.

Centrifuger les extraits cellulaires à 13000 tours par minute pendant 10 min à 4°C.

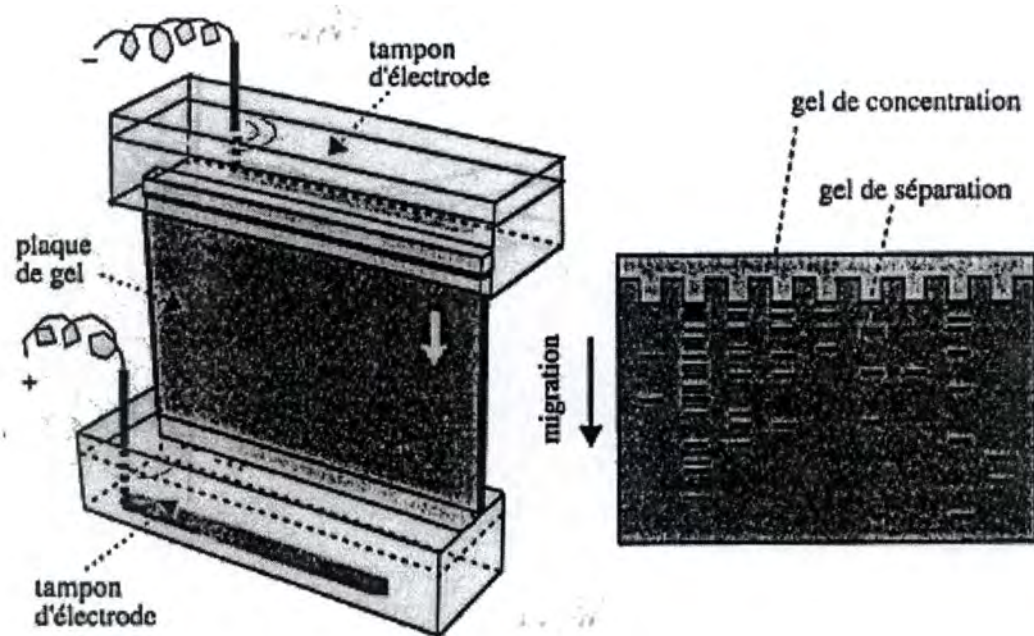
Récolter les surnageants et stocker les lysats à -80°C.

#### **III.2. Dosage des échantillons protéiques par la méthode de Bradford**

##### Matériel

- Étalon : BSA (Bovine Sérum Albumin) (solution stock à 2  $\mu\text{g/ml}$ )
- Solution de Bradford : Bio-Rad Protein Assay dilué 5X et filtrée (Biorad, Allemagne)
- Eau distillée
- Extraits protéiques issus de fibroblastes IMR-90
- Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro)
- Tampon de lyse





**Figure 2.1:** Schéma illustrant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### Méthodes

Placer 2 µl d'échantillons protéiques dans 1 ml de solution de Bradford.

Incuber à température ambiante pendant 5 min.

Lire les valeurs d'absorbance à 595 nm.

Un dosage est également réalisé pour 5 µg de BSA.

Des blancs sont réalisés en utilisant de l'H<sub>2</sub>O pour la BSA et du tampon de lyse pour les échantillons.

Déterminer la concentration protéique des échantillons d'après la valeur d'absorbance mesurée pour l'étalon.

## **III.3. Séparation des protéines par SDS-Page**

### **III.3.1 Préparation des gels**

#### Matériel

- Gel de séparation 12%: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1%, acrylamide 12%; bisacrylamide 0,32%, H<sub>2</sub>O, Temed, APS (Amonium persulfate 0,05%)
- Gel de concentration ou d'ampilement: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1%, acrylamide 3%; bisacrylamide 0,08%, H<sub>2</sub>O, Temed, APS (Amonium persulfate 0,1%)
- Tampon d'électrophorèse (pH 8,3-8,4) Tris-HCl 25 mM, glycine 0,192 M et SDS 0,1 %

#### Méthode

Couler le gel de séparation entre deux plaques en verre.

Laisser polymériser 1 h.

Couler le gel de concentration et placer un peigne afin de délimiter les puits.

Laisser polymériser 1 h.

Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse

### **III.3.2 Traitement des échantillons**

#### Matériel

- Extraits protéiques de fibroblastes IMR-90
- Centrifugeuse (Ultraspéc 2100 pro)
- Étalon de poids moléculaire : Seeblue plus 2 (Invitrogen, USA)
- Bleu de charge: 10 ml SDS 20%; 17,5g de bleu de bromophénol; 10 ml de glycérol; 10 ml de tris-HCl 0,5 M pH6,8; 5 ml mercaptoEtOH
- Microtubes
- Générateur (Biorad Power PAC 300)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)

#### Méthode

Préparer les extraits protéiques dans des microtubes avec le bleu de charge dilué 5 fois

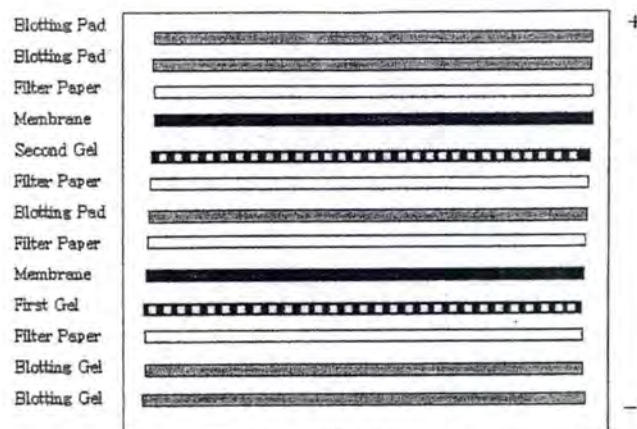
Faire bouillir à 100°C pendant 4 min.

Centrifuger les échantillons à 13 000 tours par minute pendant 10 min.

Déposer les échantillons et l'étalon de poids moléculaire sur le gel de concentration.

Laisser migrer les échantillons pendant ± 45 min en appliquant une différence de potentiel de 200 V jusqu'à ce que le front de bleu de bromophénol atteigne l'extrémité du gel (**figure 2.1**).



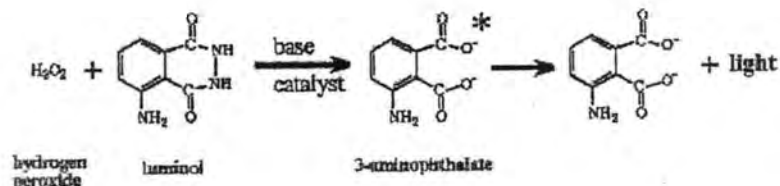


Système sandwich

**Figure 2.2:** Représentation schématique du système sandwich utilisé lors du transfert des protéines du gel vers la membrane en PVDF.

Anticorps primaires			Anticorps secondaire				
Protéine cible	Firme	Référence	Dilution	Espèce	Firme	Référence	Dilution
p21	Santa Cruz	sc-6246	1/5000	souris	Amersham	NA931V	1/200000
$\alpha$ -tubuline	Sigma	T5168	1/60000	souris	Amersham	NA931V	1/200000
Cavéoline 1	BD Biosciences	610406	1/1000	souris	Amersham	NA931V	1/150000
Rac1	Pierce	89856	1/1000	souris	Amersham	NA931V	1/150000
Phospho-cav-1	BD Biosciences	611338	1/1000	souris	Amersham	NA931V	1/150000

**Tableau 2.1 :** Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la détection de protéines d'intérêt par la méthodes du Western Blot. L'origine, la référence et la dilution utilisée pour chacun sont également repris.



**Figure 2.3:** Réaction de chémluminescence : en présence de luminol, la peroxydase HRP réagit avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Un photon est émis et est capté sur un film autoradiographique.

### **III.4 Transfert sur membrane**

Les extraits protéiques sont transférés sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). La méthode de transfert utilisée est le transfert « semi-sec » (les éponges et les papiers Whattman sont imbibés de tampon de transfert) selon un montage dit en « sandwich » (**figure 2.2**). C'est l'application d'une différence de potentiel entre le gel d'électrophorèse et la membrane de PVDF qui permet le transfert des protéines.

#### Matériel

- Membrane de transfert PVDF (PolyVinylDièneFluoride) (Amersham, UK)
- Méthanol (Acros organics, Belgique)
- Tampon de transfert : Tris 40mM, glycine 0,3M, méthanol 20%
- Cuve de transfert (Hoefer SemiPhor)
- Papier Whattman (Merck, Allemagne) et éponges
- Générateur (Bio-Rad Power PAC 300)

#### Méthode

Démonter les plaques d'électrophorèse et enlever le gel de concentration à l'aide d'un scalpel. Préparer une membrane de PVDF: incuber la membrane 1 min dans du méthanol puis 15 min dans du tampon de transfert. Les éponges et le papier Whattman du montage sont aussi imbibés par ce tampon.

Former le « sandwich » selon le schéma de la **figure 2.2**

Transférer les protéines du gel vers la membrane pendant 2h30 à 150 mA.

### **III.5 Traitement de la membrane**

#### Matériel

- Tampon de rinçage : Tris Buffered Saline (TBS) Twen 0.1%,
- TBS Twen 0.1%+2% lait (Amersham, UK)
- Anticorps primaires et secondaires (**tableau 2.1**)
- Substrat de révélation : ECL (Enhanced Chemo Luminescence) (Amersham, UK)
- Film autoradiographique (ECL Amersham, UK)
- Solutions de révélation et de fixation (ILFORD Imaging, England)
- Logiciels image master laboscan V2003.01 et image quant V2003.03
- Cassettes (Amersham, UK)

#### Méthode

Placer la membrane en présence de TBS-T+2% de lait pendant 2 h à température ambiante (les protéines en contact avec la solution).

Incuber la membrane dans une solution de TBS-T+2% de lait contenant les anticorps primaires dilués pendant 1 h sous agitation constante.

Rincer 3 x 15 min avec du TBS-T.

Incuber la membrane dans une solution de TBS-T+2% de lait contenant les anticorps secondaires dilués pendant 45 min sous agitation constante.

Rincer 3 x 15 min avec du TBS-T pour enlever l'excédent d'anticorps.

Placer la membrane en contact avec la solution de révélation pendant 5 min (**figure 2.3**).

Placer la membrane entre deux transparents dans une cassette.

En chambre noire, placer un film autoradiographique sur la membrane.

Incuber le film dans la solution de révélation jusqu'à ce que les bandes apparaissent, rincer brièvement dans l'eau.



	<b>Protocole 1</b>	<b>Protocole 2</b>	<b>Protocole 3</b>	<b>Protocole 4</b>
<b>Fixation</b>	10 min avec du Paraformaldéhyde 3%	10 min avec du Paraformaldéhyde 3%	10 min avec de l'éthanol 96%	20 min avec de méthanol 80%/acétone 20%
<b>Rinçage</b>	3X PBS	3X PBS et 10 min au NH <sub>4</sub> Cl/PBS 25 mM	3X PBS	
<b>Perméabilisation</b>	5 min avec du PBS + Triton x-100 1%	10 min avec du PBS + Triton x-100 0,1%	10 min avec du PBS + Triton x-100 0,1%	
<b>Rinçage</b>	3X10 min avec du PBS/BSA 2%	3X10 min avec du PBS/BSA 2%	3X10 min avec du FBS 10%	3X10 min avec du PBS/BSA 2%

**Tableau 2.2 :** Comparaison des différents protocoles de fixation et de perméabilisation utilisés en immunofluorescence.

Incuber le film dans la solution de fixation pendant 3 min et rincer à l'eau de ville.  
Réaliser la quantification des bandes obtenues en utilisant les logiciels image master laboscan V2003.01 et image quant V2003.03

#### **IV. Marquage en Immunofluorescence**

L'immunofluorescence est une technique destinée à détecter un antigène par émission de fluorescence. La préparation est examinée au microscope. Un anticorps non marqué va se fixer sur un antigène. Cet anticorps va être révélé par un anticorps anti-immunoglobuline, marqué par un fluorochrome, une sonde Alexa. Cette sonde fluorescente est visible au microscope confocal, elle peut émettre dans le vert (488 nm) ou dans le rouge (568 nm).

##### Matériel

- PBS
- PBS/BSA 2% (Sigma, USA)
- FBS 10%
- NH<sub>4</sub>Cl/PBS 25 mM
- PBS + Triton x-100 1%, PBS + Triton x-100 0,1% (Merck, Allemagne)
- Paraformaldéhyde 3%
- Ethanol 96% (Merck, Allemagne)
- Anticorps primaires : IgG anti-cavéoline1 : IgG polyclonal de souris (dilution 100x) (BD Biosciences, )
- Anticorps secondaires anti-souris couplé à un sonde Alexa 568 ou 488 (dilution 500x) (Molecular Prodes, USA)
- TOPRO-3 (Molecular Prodes, USA) dilué 80X dans RNase 2 mg/ml
- Mowiol (Sigma, USA)

##### Méthode

La veille de l'expérience, repiquer les fibroblastes IMR-90 sur lamelle en verre dans une plaque 24 puits à la confluence de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup>.

Lors de ce mémoire, quatre protocoles de fixation/perméabilisation ont été testés lors des mises au point (**tableau 2.2**).

Sur un parafilm en chambre humide, déposer 30 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA.

Retourner chaque lamelle sur la goutte d'anticorps.

Incuber l'anticorps pendant 2h à température ambiante ou toute la nuit en chambre froide.

Rincer 3 fois les lamelles avec du PBS/BSA.

Sur un parafilm en chambre humide, déposer 30 µl d'anticorps secondaire dilué dans du PBS/BSA.

Incuber pendant 1h en chambre humide à l'abri de la lumière pour préserver les fluorochromes de la photodécoloration.

Rincer 3 fois les lamelles avec du PBS.

Diluer 80 fois le TOPRO-3 (longueur d'onde d'excitation : 640 nm) dans de la RNase à 2 mg/ml de PBS.

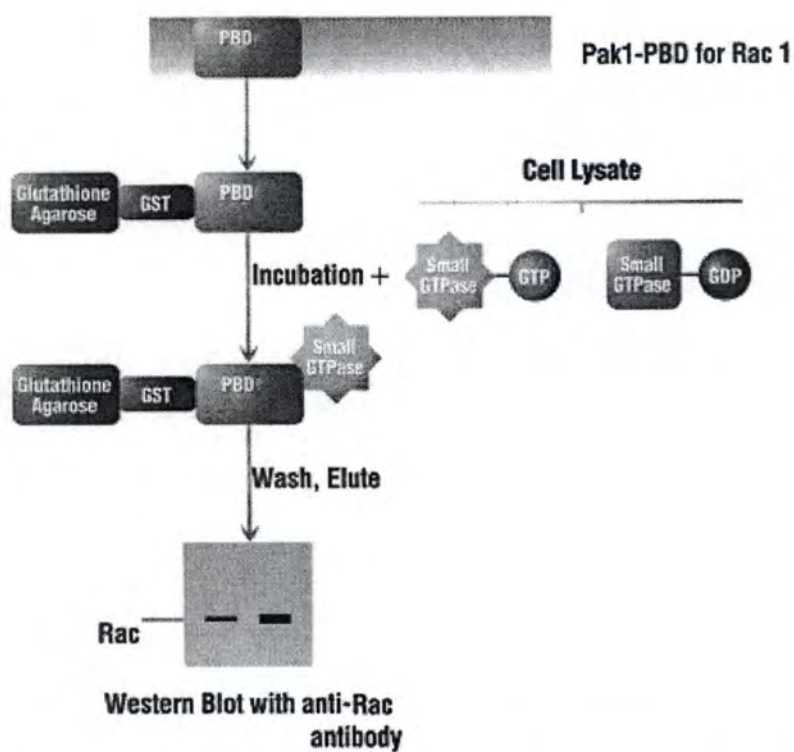
Sur un parafilm en chambre humide, déposer 30 µl de TOPRO-3 dilué.

Incuber pendant 30 min dans l'obscurité.

Rincer 3 fois les lamelles avec du PBS et monter les lamelles sur lames porte-objet à l'aide de mowiol préchauffé à 60°C. Le mowiol préserve la fluorescence.

Incuber 24 h à 4°C et observer les lamelles à l'aide du microscope confocal.





**Figure 2.4 :** Représentation de la technique de purification de Rac-1 liée au GTP à partir d'extraits protéiques issus des fibroblastes IMR-90 (<http://www.piercenet.com>).

Des contrôles sont réalisés pour les anticorps primaires et secondaires en plaçant uniquement du PBS/BSA sur les lamelles.

## V. Détection de l'activité de Rac-1

Rac-1 est activée lorsqu'elle est liée au GTP. La protéine Rac-1 active se lie spécifiquement au PDB (p21 Binding Domain) de PAK1 (p21 activated protein kinase). L'utilisation du PDB de Pak-1 en tant que sonde permet d'isoler de manière spécifique la forme active de Rac-1. Le kit EZ-Detect™ Rac1 Activation Kit utilise une protéine de fusion contenant 2 domaines : le domaine Glutathion S Transférase (GST) et le domaine PDB afin de séquestrer Rac-1 lié au GTP. La protéine de fusion se lie au glutathion de la colonne via le domaine GST. On ajoute ensuite le lysat cellulaire contenant Rac-1 activé. Ce dernier se lie au domaine PDB de la protéine de fusion, les protéines non-liées sont éluées. Une augmentation de la température permet ensuite de récupérer Rac-1 lié au GTP. Rac1 peut être analysé par Western-blot (**figure 2.4**).

### Matériel

- Solution provenant du kit EZ-Detect™ Rac1 Activation Kit (Pierce, USA)
  - Protéine de fusion contenant 2 domaines : Glutathion S Transférase (GST) et le domaine PDB (p21 Binding Domain) de la protéine PAK1
  - Anticorps de souris anti-Rac1
  - GTP $\gamma$ S
  - GDP
  - Fragments de gels de glutathion
  - Tampon de lyse, liaison et lavage (LBW) : Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NP-40 1%, DTT 1 mM et glycérol 5%, inhibiteurs de protéases: PIC 40% (Roche, Germany)
  - Tampon d'échantillon: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glycérol 2%, SDS 4% et bleu de bromophénol 0,05%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%
  - Colonnes
  - Microtubes
- Milieu de rinçage: PBS
- EDTA 0,5M pH 8 (Merck, Allemagne)
- MgCl<sub>2</sub> 1 M (Merck, Allemagne)

### Méthode

#### V.1 Lyse cellulaire

Rincer 1x les cellules avec 10 ml PBS.

Ajouter 500  $\mu$ l de tampon LBW par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

Racler les cellules et placer le lysat cellulaire dans un microtube.

Agiter brièvement.

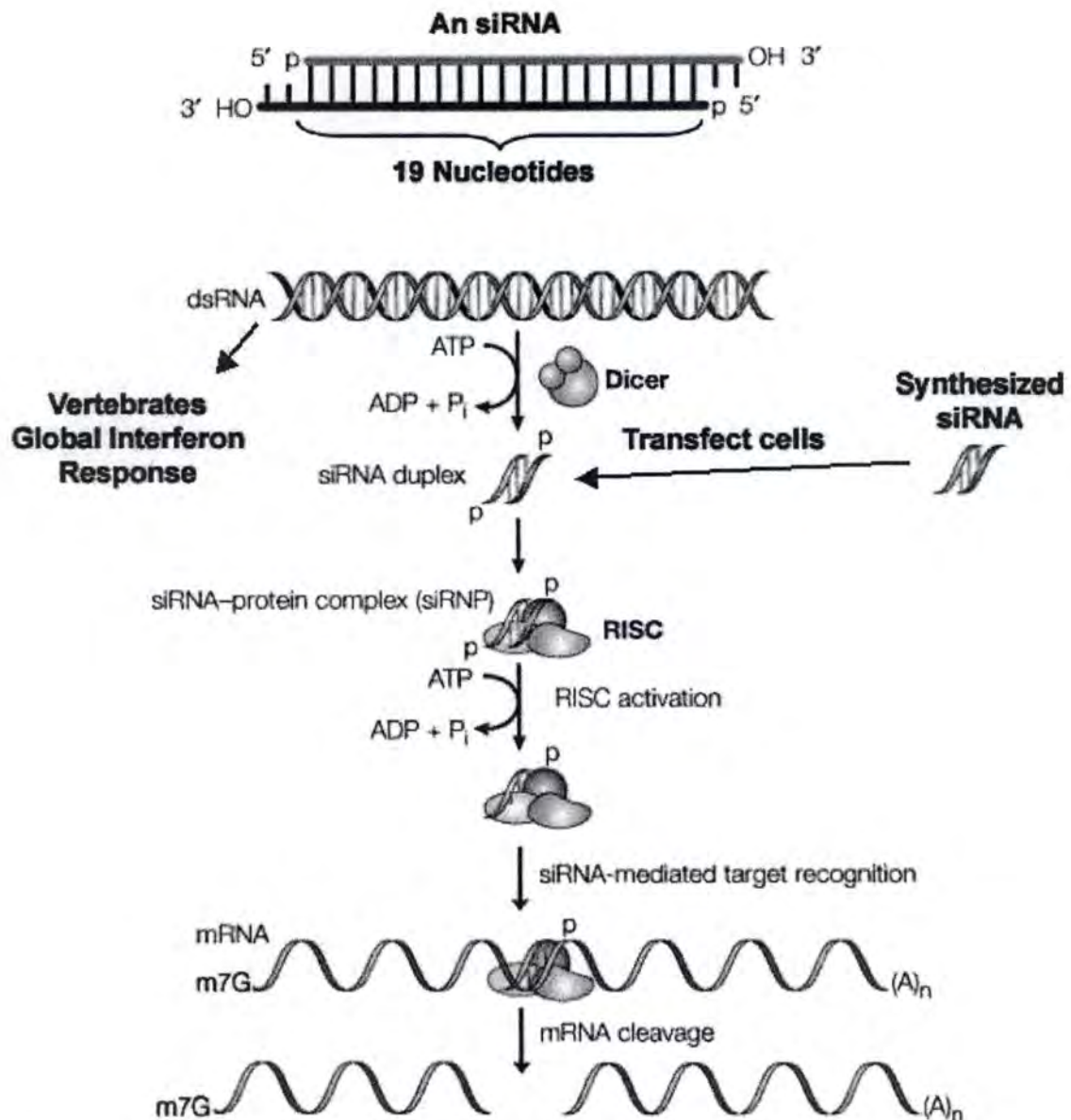
Centrifuger 16000 g pendant 8 min à 4°C.

Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

Prélever 8  $\mu$ l de chaque échantillon pour réaliser un dosage protéique par la méthode de Bradford (voir paragraphe III.2.).

Congeler immédiatement les échantillons dans l'azote liquide et conserver les aliquots à -70°C.





**Figure 2.5 : Illustration de la voie menant à la dégradation de l'ARNm par utilisation de siRNA.** Les siRNAs sont des séquences d'environ 19 nucléotides, possédant deux bases non appariées en 3' et phosphorylées en 5'. *In vivo*, les dsRNA (Long double-stranded (ds)RNA) sont clivés en siRNAs par un membre de la famille des RNases III : Dicer. Cette réaction nécessite de l'ATP. Les siRNAs formés sont incorporés dans le complexe RISC. L'introduction des siRNAs dans le complexe RISC se réalise de manière ATP indépendante, l'activité hélicase quant à elle nécessite un apport d'énergie. Une fois déroulé, les siRNAs simple brin guide RISC vers les messagers complémentaires à leur séquence. Ces derniers vont subir un clivage endonucléotidique. *In vitro*, des siRNAs exogènes peuvent être introduits dans les cellules par transfection (d'après Dykxhoorn *et al.*, 2003).

## **V.2 Préparation d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif par traitement *in vitro* de lysats cellulaires avec du GTP $\gamma$ S ou du GDP**

Pour 2 échantillons, ajouter 10  $\mu$ l EDTA 0,5M pH 8 dans 500  $\mu$ g/500  $\mu$ l de lysat cellulaire (concentration finale de 10 mM).

Ajouter 5  $\mu$ l de GTP $\gamma$ S 10mM (concentration finale de 0,1 mM), ou 5  $\mu$ l de GDP 100 mM (concentration finale de 1 mM).

Placer à 30°C durant 15 min sous agitation douce (600 tours par minute).

Placer les échantillons à 4°C.

Ajouter 32  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 1 M (concentration finale de 60 mM).

Procéder ensuite à la précipitation d'affinité de Rac-1 de la même manière que pour les autres échantillons.

## **V.3 Précipitation d'affinité de Rac1**

Pour chaque échantillon, placer un fragment de gel de glutathion dans une colonne, elle-même placée dans un microtube.

Ajouter 10  $\mu$ l de protéine de fusion (GST-Pak1-PDB) à la colonne contenant le disque.

Immédiatement, transférer sur la colonne 500  $\mu$ g/500  $\mu$ l de lysat cellulaire et agiter rapidement.

Incuber à 4°C pendant 1 h sous agitation douce (600 tours par minute).

Centrifuger la colonne avec le microtube 30 sec à 7200 g.

Transférer la colonne dans un nouveau microtube.

Laver la résine 3x avec 400  $\mu$ l Tampon LBW et centrifuger 30 sec à 7200 g.

Transférer la colonne dans nouveau microtube.

Ajouter 50  $\mu$ l de tampon d'échantillon.

Placer les échantillons 5 min à 100°C.

Centrifuger 2 min à 7200 g.

Congeler les éluats à -20°C ou réaliser le Western blot de suite

## **VI. Transfection des IMR-90 avec des ARN interférents spécifiques des transcrits de la cavéoline-1**

Les ARN interférents sont utilisés pour dégrader des ARNm de façon spécifique. Les siRNA « Small-Interfering RNA » sont des duplexes de 21 à 23 nucléotides contenant deux bases non appariées en 3'. Une fois dans la cellule, les siRNA sont incorporés dans le complexe RISC « RNA-Induced Silencing Complex ». Une activité hélicase, présente au niveau du complexe, dépendante de l'ATP permet l'accès de siRNA à l'ARNm cible. Une fois la séquence reconnue, la molécule d'ARNm va être dégradé par le complexe RISC. (figure 2.5).

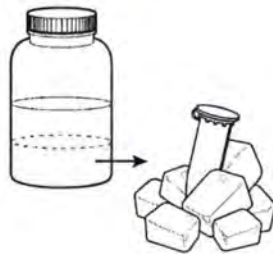
### Matériel

- MEM
- MEM+AB+20% FBS
- Agent transfectant : Jetsi (Eurogentec, Belgique). Le Jetsi est un agent lipofectant qui compresse les duplex de siRNA en petites particules chargées capables d'interagir avec les protéoglycans de la surface cellulaire. Ces propriétés permettent aux siRNA

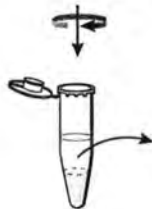




Ajouter 10  $\mu$ l d'actétate de sodium 2 M au lysat cellulaire contenant la solution de dénaturation



Ajouter 100  $\mu$ l de Phénol:Choloroforme:Isoamyl Alcool, agiter rapidement pendant 10 sec. Incuber 15 min sur glace.



Centrifuger pendant 20 min à 12000 tours par minute à 4°C et mettre sur glace

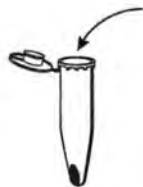
Transférer la phase aqueuse dans un nouveau microtube



Ajouter un volume égal d'isopropanol et et incuber à -20°C pendant minimum 30 min



Centrifuger pendant 10 min à 13000 tours par minute, 4°C



Resuspendre le culot avec 1 ml d'éthanol 75% glacé



Agiter rapidement puis centrifuger pendant 10 min à 13000 tours par minute à 4°C



Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air pendant au maximum 15 min. Resuspendre l'ARN total dans 20  $\mu$ l d'eau. Incuber pendant 10 min à 55°C, agiter rapidement.

**Figure 2.6 :** Illustration du protocole d'extraction et de purification de l'ARN total (Promega).

de pénétrer rapidement dans la cellule par endocytose et d'être protégés contre la dégradation.

- siRNA dirigés contre la cavéoline-1 humaine: « siGENOME SMARTpool reagent M-003467-01-0010 », stock à 100  $\mu$ M (Dharmacon, Belgique). Il s'agit de différentes séquences spécifiques de la cavéoline-1.
- siRNA contrôle négatif: « siRNA control duplexes OR-0030-NEG05.10.20 » stock à 100  $\mu$ M (Eurogentec, Belgique). Il s'agit d'une séquence de siRNA qui ne reconnaît aucune séquence dans le génome humain.

#### Méthode

Diluer le Jetsi dans du MEM selon la formule suivante :  $x \text{ ng siRNA} \times 0,003 = y \text{ } \mu\text{l de Jetsi}$ . Agiter fortement et laisser à température ambiante durant 10 min.

Diluer les siRNA selon la concentration désirée dans du MEM, agiter doucement.

Diluer 2X le mélange MEM+siRNA en déposant le mélange MEM+Jetsi, agiter rapidement 10 sec et incubé 30 min à température ambiante. Remplacer le milieu des cellules par 2,7 ml de MEM par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> ou 5,4 ml par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

Diluer 10X le mélange contenant les siRNA en le déposant goutte à goutte dans le milieu des cellules et incubé 4 h à 37°C.

Ajouter 3 ml de milieu MEM+AB+20% FBS par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> ou 6 ml par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

### **VII. Extraction d'ARN total**

L'extraction d'ARN total est une étape critique et nécessaire à de nombreuses applications telles que: l'analyse en Northern blot, la construction de banque d'ADNc ou encore la transcription inverse. Chomczynski et Sacchi ont décrit en 1987, une technique d'isolation de l'ARN total (Chomczynski *et al.*, 1987). C'est sur cette technique qu'est basé le « Total RNA Isolation System » utilisé au cours de ce mémoire. Il comprend 4 étapes principales : la lyse des fibroblastes IMR-90, la dénaturation des complexes nucléoprotéiques, l'inactivation de l'activité des ribonucléases endogènes et l'élimination de l'ADN et des protéines contaminantes (**figure 2.6**). Ces étapes sont réalisées en absence de RNases. Afin de diminuer la vitesse de dégradation de l'ARN total, toutes les étapes de l'extraction se déroulent à 4°C.

#### Matériel

- Solution provenant du kit : Total RNA Isolation System (Promega, USA):
  - Solution de dénaturation
  - Acétate de sodium 2 M pH4,0
  - Phénol:Choloroforme :Alcool isoamylique en proportions 99:24:1, pH 4,7
  - Isopropanol
  - Eau distillée sans RNase
- Ethanol 75% (Merck, Allemagne)
- Milieu de rinçage: PBS



## Méthode

### **VII.1 Extraction d'ARN total**

Rincer des cellules 1X avec 5 ml de PBS par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> ou 10 ml par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

Ajouter 60 µl de solution dénaturante par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (ou 300 µl par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>) et racler les cellules. La solution dénaturante contient 2 inhibiteurs de RNase, le guanidine thiocyanate et le β-mercaptoéthanol. Le guanidine thiocyanate et le N-lauryl sarcosine aussi présent dans cette solution permettent la disruption des complexes nucléoprotéiques.

Transférer le lysat cellulaire dans un microtube.

Ajouter 10 µl d'acétate de sodium 2 M.

Ajouter 100 µl de Phénol:Chloroforme; Alcool Isoamyl (PCI alcool) par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (300 µl par boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup>) et mélanger par inversion. Le PCI alcool permet d'enlever les protéines et l'ADN chromosomique contaminants.

Agiter rapidement pendant 10 sec.

Incuber 15 min sur glace et centrifuger pendant 20 min à 12000 tours par minute.

### **VII.2 Précipitation et resuspension de l'ARN total**

Récupérer délicatement la phase supérieure aqueuse qui contient l'ARN total.

Transférer l'ARN total dans un nouveau microtube.

Ajouter un volume égal d'isopropanol.

Inverser 5X et incuber à -20°C pendant minimum 30 min.

Centrifuger 10 min à 13000 tours par minute.

### **VII.3 Lavage de l'ARN total**

Resuspendre le culot avec 1 ml d'éthanol 75% glacé.

Agiter rapidement puis centrifuger pendant 10 min à 13000 tours par minute.

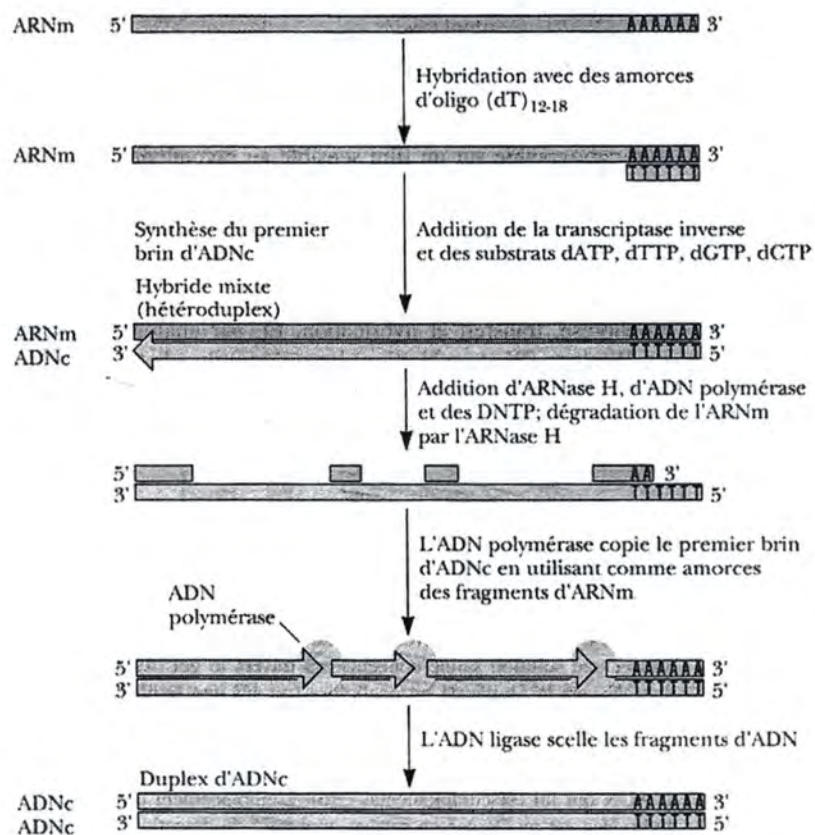
Éliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air durant au maximum 15 min.

Resuspendre l'ARN total dans 20 µl d'eau.

Incuber pendant 10 min à 55°C, agiter rapidement.

## **VIII. Transcription inverse**

La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARNm grâce à l'ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase inverse. Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus dont elles sont une des principales caractéristiques. Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm eucaryotes par exemple), l'amorce à utiliser doit contenir une succession de désoxythymidines dans sa séquence. Dans ce cas, tous les ARNm sont *a priori* copiés en ADNc. Lorsque la synthèse du brin complémentaire de l'ARNm est terminée, on ajoute de l'ARNase H et de l'ADN polymérase. L'ARNase H hydrolyse spécifiquement les chaînes d'ARN des hybrides ARN:ADN. L'ADN polymérase copie le premier brin d'ADNc en utilisant comme amorce les segments d'ARN résiduels. Elle a une activité exonucléase 5'→3' qui élimine l'ARN résiduel au cours de la



**Figure 2.7 :** Illustration de la synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse (Garrett et Grisham, 2000).



progression de la synthèse d'ADN. Les fragments d'ADN qui dans le second brin d'ADN sont séparés sont ligaturés par une ADN ligase (**figure 2.7**).

#### Matériel

- RNasin Ribonucléase inhibiteur 40 unités/ $\mu$ l (Promega, USA)
- Ribonuclease H 2 unités/ $\mu$ l (Gibco BRL)
- Eau RNase-free (Promega, USA)
- Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l (Invitrogen, USA)
- dNTP set 100 mM (Eurogentec, Belgique)
- SuperScript II Reverse Transcriptase 200 unités/ $\mu$ l (Invitrogen, USA)
- Buffer 5X (Invitrogen, USA)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, USA)
- ARN issu des fibroblastes IMR-90 des différentes conditions étudiées

#### Méthode

Dans un microtube « RNase-Free », placer 2  $\mu$ g/7,5 $\mu$ l d'ARN total (diluer dans de l'eau RNase-Free) en présence de 2  $\mu$ l d' Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer et incubé 10 min à 70°C .

Préparer le mix suivant :

- 4  $\mu$ l Buffer 5x
- 2  $\mu$ l DTT 0,1M
- 1  $\mu$ l RNasin (40U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l eau « RNase-free ».

Mettre sur glace pendant 5 min.

Ajouter 9  $\mu$ l de mix par échantillon et incubé 5 min à température ambiante.

Ajouter 1,5  $\mu$ l de SuperScript II Reverse Transcriptase par échantillon.

Incuber 1h30 à 42°C puis 15 min à 70°C.

Ajouter 1  $\mu$ l de Ribonuclease H et incubé 20 min à 37°C.

Congeler immédiatement à -20°C.

### **IX. PCR en temps réel**

La PCR en temps réel est une méthode permettant de détecter l'expression de transcrits même faiblement abondants. Elle permet de mesurer la fluorescence émise par l'accumulation de produits PCR au cours chaque cycle de la réaction. Les amplicons peuvent être rendus fluorescents de différentes manières. Au cours de ce travail nous avons utilisé le SYBR Green. Ce dernier émet un signal fluorescent une fois intercalé dans l'ADN double brin. Ainsi, il permet de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque cycle PCR. Pour être semi-quantitative, la PCR doit être tout à fait spécifique de l'amplicon défini. Cependant, le SYBR Green s'intercale de façons non spécifique dans l'ADN double brin. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplicon, une augmentation progressive de la température de 60° à 95°C en fin de PCR permet la dissociation des amplicons. Cette dissociation provoque une chute brutale de fluorescence. Si la dérivée de la courbe de dissociation en fonction du temps présente un pic unique, ceci reflète la présence d'une seule population d'amplicons.

La quantification du niveau d'ADNc de départ de la PCR se fait par la détermination du cycle seuil. Ce cycle correspond au moment où le signal de fluorescence émis par le SYBR Green peut être discriminé du niveau basal (bruit de fond). Cette quantification se fait en parallèle avec celle d'un gène dont le niveau d'ARNm est stable dans les diverses conditions étudiées, c'est le gène de référence. Dans ce travail, le gène de référence est le

Gène	amorce sens	amorce antisens	Longueur amplicon
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA	110 pb
Cavéoline	CGCACACCAAGGAGATCGA	GTGTCCCTTCTGGTTCTGCAAT	105 pb

**Tableau 2.3 :** Tableau reprenant le nom du gène amplifié par PCR en temps réel, séquence des amorces sens et anti-sens utilisées et longueur de l'amplicon généré lors de la PCR en temps réel.



gène codant pour la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase). La PCR en temps réel a été utilisée afin de déterminer l'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1.

#### Matériel

- ADNc des fibroblastes IMR-90
- SYBR Green PCR Master Mix: SYBR Green, Amplitaq Gold polymérase, dNTP, buffer 2X (Applied Biosystems, USA)
- Amorces sens et antisens (Applied Biosystem, UK)) (**Tableau 2.3**)
- Plaque 96 puits (Applied Biosystems USA)
- Eau distillée
- 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)
- SDS 2.2.1 (Applied Biosystems, USA)

#### Méthodes

Préparer le mix :

- eau distillée
- amorce sens stock à 3  $\mu$ M et concentration finale 300 nM
- amorce antisens stock à 3  $\mu$ M et concentration finale 300 nM
- SYBR Green PCR Master Mix à diluer 2x au final

Déposer 20  $\mu$ l de mix par puit et y ajouter 5  $\mu$ l d'ADNc dilué ou 5  $\mu$ l d'eau distillée pour les blancs.

Centrifuger pendant 5 min à 600 tours par minute.

Placer la plaque dans le 7900HT Fast Real-Time PCR system et enclencher les cycles de PCR à savoir : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C, 40 fois 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Pour la courbe de dissociation : grandiant de temprérature allant progressivement de 60°C à 95°C).

## Résultats et Discussion



## **Quatrième partie : Résultats et Discussion**

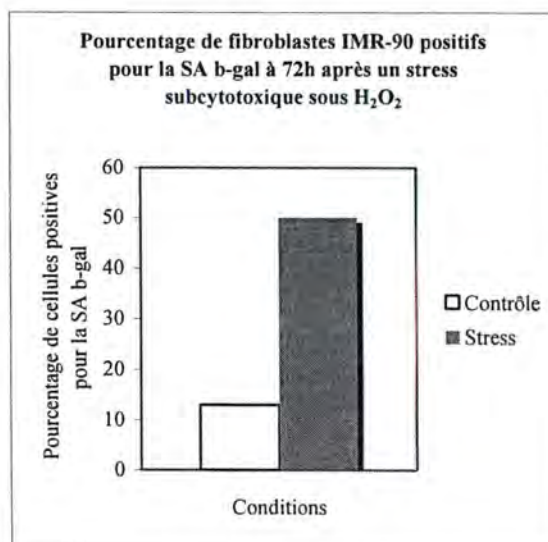
Au cours de ce mémoire, des fibroblastes de poumon fœtaux humain de souche IMR-90 ont été utilisés comme modèle cellulaire dans le cadre d'une étude de la sénescence induite prématurément par un stress (SIPS). Dans notre cas, le stress était de type oxydatif et subléthal unique de 2 h avec du peroxyde d'hydrogène 150  $\mu$ M. Les marqueurs de sénescence apparaissent entre 48 et 72 h après l'exposition à l' $H_2O_2$  (Fripiat *et al.*, 2002). Nous avons vérifié que ces conditions induisent bien l'apparition des marqueurs de la sénescence suivants : activité SA  $\beta$ -Gal, diminution prononcée du potentiel prolifératif et augmentation de l'abondance de p21<sup>WAF-1</sup>.

### **I. Etude des marqueurs de la sénescence pour des fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par l' $H_2O_2$**

#### **I.1 Activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence**

Dimri et son équipe ont montré que l'activité  $\beta$ -galactosidase des cellules sénescents est détectable par coloration histochimique à pH 6 (Dimri *et al.*, 1995). Au cours d'une étude ultérieure, cette activité a été détectée dans des fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par l' $H_2O_2$  (Fripiat *et al.*, 2002).

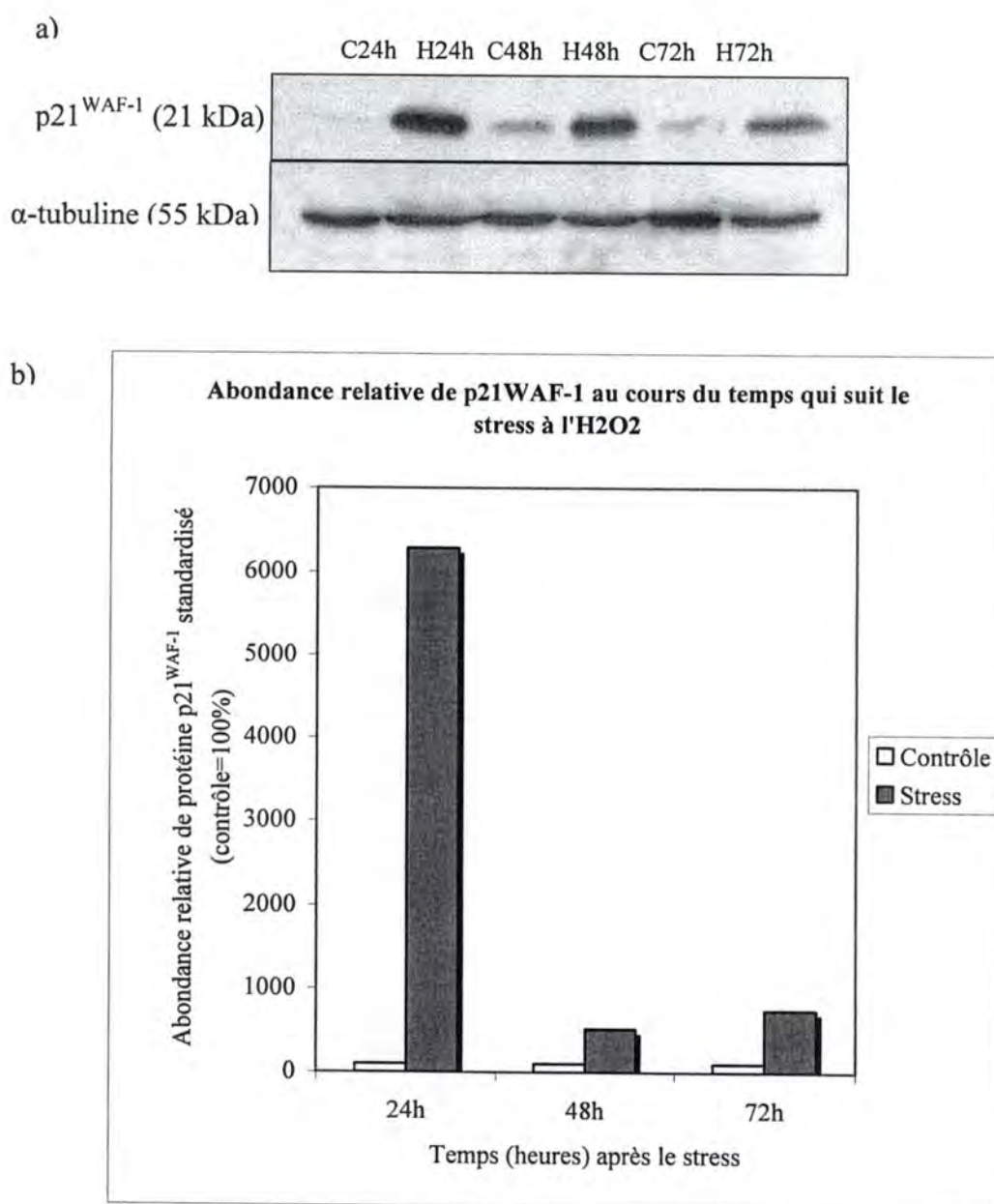
L'étude de l'activité SA  $\beta$ -Gal a été réalisée à 72 h après le stress à l' $H_2O_2$  sur des fibroblastes IMR-90 contrôles et stressés. Nous avons observé une augmentation de plus de 2 fois de la proportion de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -Gal chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles (**figure 3.1**).



**Figure 3.1 :** Pourcentage de fibroblastes IMR-90 positifs pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -Gal) dans les deux conditions étudiées (fibroblastes contrôle: et fibroblastes stressés à l' $H_2O_2$ ).

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .



**Figure 3.3 :**

a) Détection de p21<sup>WAF-1</sup> par Western blot à différents temps après le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir d'extraits protéiques obtenus à 24, 48 et 72 h après le stress. L'α-tubuline est utilisée comme référence (C= contrôle, H= cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant l'abondance relative de protéine p21<sup>WAF-1</sup> pour des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées à 24, 48 et 72 h après le stress.

Les valeurs obtenues pour p21<sup>WAF-1</sup> ont été normalisées par celles obtenues pour l'α-tubuline. Les abondances relatives de p21<sup>WAF-1</sup> ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

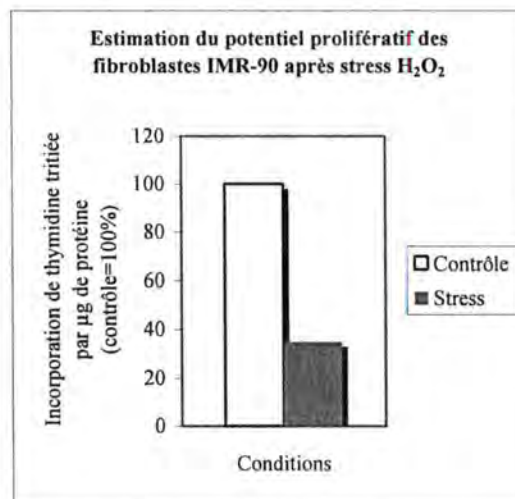


## I.2 Estimation du potentiel prolifératif

La sénescence répliquative et la SIPS sont caractérisées par l'arrêt de la prolifération de la majorité de la population cellulaire suite à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 /S. Le potentiel prolifératif peut être estimé en suivant l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules, ce qui reflète la capacité de synthèse de l'ADN (Cristofalo *et al.*, 1973). L'arrêt du cycle cellulaire peut également être mis en évidence par l'étude de l'abondance protéique de p21<sup>WAF-1</sup>, un inhibiteur de complexe CDK/cycline.

### I.2.1 Incorporation de la thymidine tritiée

Nous avons tout d'abord mesuré l'incorporation de la thymidine tritiée afin d'estimer le potentiel prolifératif des fibroblastes IMR-90 entre 48 et 72 h après le stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats ont été rapportés à la quantité de protéines cellulaires totales. Nous avons observé une diminution du potentiel prolifératif de 65% dans les cellules stressées au peroxyde d'hydrogène par rapport aux cellules contrôles. La capacité de synthèse d'ADN des cellules en SIPS induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble donc bien être altérée (**figure 3.2**).

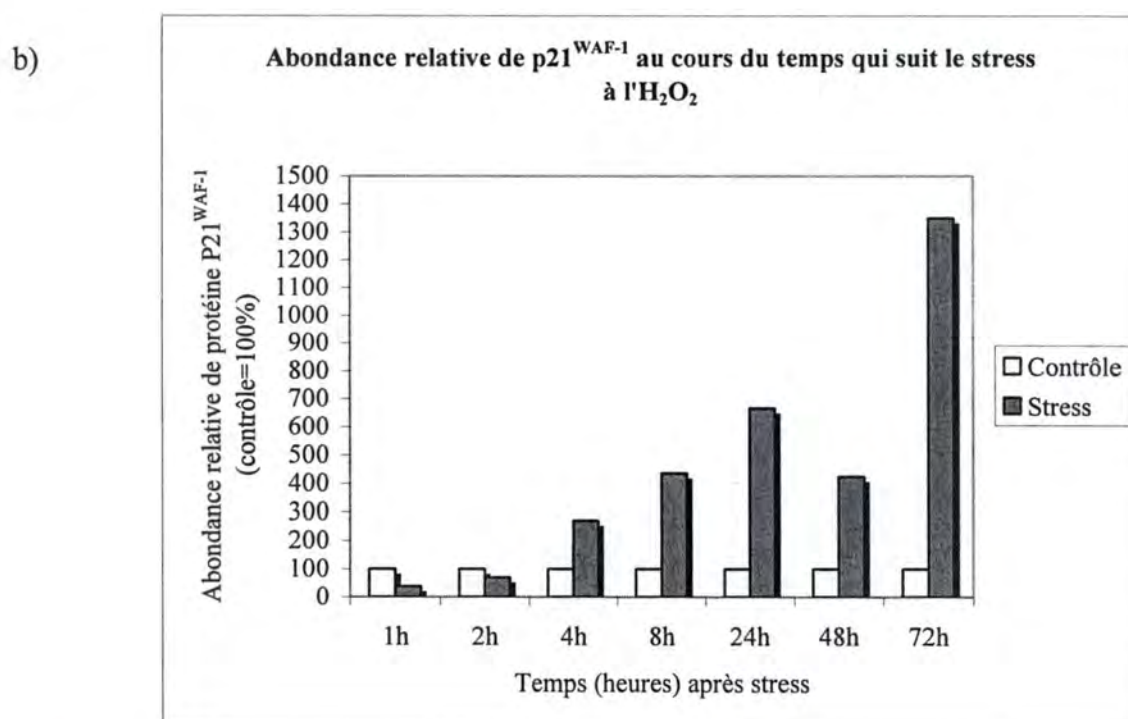
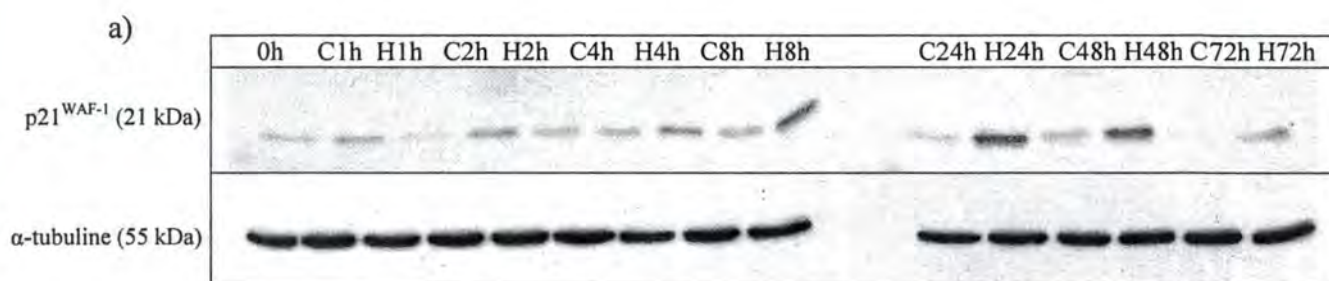


**Figure 3.2** : Estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées (contrôles : colonne blanche et fibroblastes stressés à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : colonne grise). La mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée a été réalisée entre 48 et 72 h après le stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats ont été normalisés par la quantité de protéines cellulaires présentes dans les deux conditions au départ de l'expérience. Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles.

### I.2.2 Abondance protéique de l'inhibiteur de CDK/cycline : p21<sup>WAF-1</sup>

Nous avons étudié l'abondance relative de protéine p21<sup>WAF-1</sup> à différents temps après le stress. Ceci a été réalisé par Western-Blot.

On observe une augmentation de l'abondance relative de p21<sup>WAF-1</sup> chez les fibroblastes IMR-90 stressés par rapport aux fibroblastes contrôles et ce à 24, 48 et 72 h après le stress. Cette augmentation est très importante 24 h après le stress. Dans les temps plus longs qui suivent le stress, cette augmentation est moins marquée mais toujours supérieure à 2 fois (**figure 3.3**).



**Figure 3.4**

a) Détection de p21<sup>WAF-1</sup> par Western blot à différents temps après le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir d'extraits protéiques obtenus à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress. L'α-tubuline est utilisée comme référence (C= contrôle, H= cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant l'abondance relative de protéine de p21<sup>WAF-1</sup> pour des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress.

Les valeurs obtenues pour p21<sup>WAF-1</sup> ont été normalisées par celles obtenues pour l'α-tubuline. Les abondances relatives de p21<sup>WAF-1</sup> ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Ces résultats, mis en relation avec les résultats obtenus par l'incorporation de la thymidine tritiée suggèrent que les fibroblastes IMR-90 soumis à un stress unique de 2 h sous  $H_2O_2$  à 150  $\mu M$  subissent un arrêt de cycle cellulaire en phase G1/S comme il a déjà été démontré.

Nous avons également étudié l'abondance relative de  $p21^{WAF-1}$  dans les temps courts qui suivent le stress à l' $H_2O_2$ . Les extraits protéiques ont été obtenus à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress pour des fibroblastes IMR-90 contrôles et stressés. À 1 et 2 h après les stress, l'abondance relative de  $p21^{WAF-1}$  diminue dans les fibroblastes stressés par rapport aux fibroblastes contrôles. L'abondance relative de  $p21^{WAF-1}$  augmente à partir de 4 h après le stress à l' $H_2O_2$  chez les cellules stressées. Les résultats obtenus à 24, 48 et 72 h sont semblables à ceux obtenus dans l'expérience précédente, l'abondance relative de  $p21^{WAF-1}$  est plus importante dans les fibroblastes stressés (figure 3.4).

## **II. Etude du niveau relatif protéique de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par un stress à l' $H_2O_2$**

Lors de ce mémoire, nous avons étudié les variations d'expression au niveau protéique de la cavéoline-1 à différents temps après le stress. La localisation subcellulaire de la cavéoline-1 suite au stress a été étudiée par un marquage en immunofluorescence.

La cavéoline-1 étant une protéine membranaire, sa mise en évidence par marquage en immunofluorescence demande des mises au point.

### **II.1 Mises au point du marquage en immunofluorescence de la cavéoline-1**

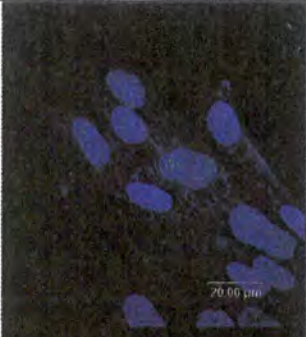



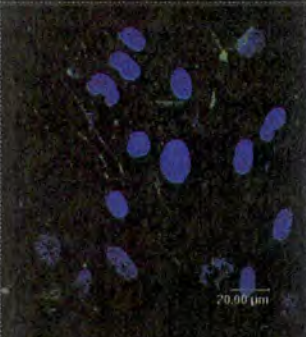
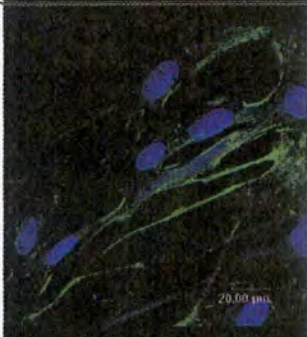

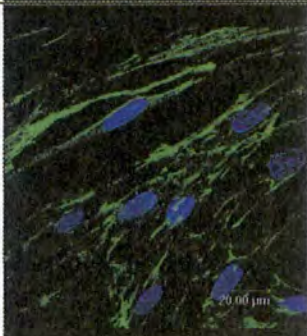
Deux étapes principales du marquage en immunofluorescence ont du être mises au point : la fixation et la perméabilisation.

La fixation doit être suffisamment « douce » pour les cellules et ne doit pas réduire l'antigénicité de manière trop importante. Ainsi, la PFA (paraformaldehyde), qui est un agent créant des doubles liaisons avec les protéines, est une méthode « douce » mais qui réduit l'antigénicité. La fixation méthanol/acétone est plus « brutale » : l'acétone déshydrate et perméabilise les cellules, de telle sorte que les protéines risquent de précipiter. L'antigénicité est cependant bien conservée. Nous avons également testé la fixation à l'éthanol 96%. De plus, la technique de fixation diffère selon l'anticorps utilisé. En effet, certains anticorps reconnaissent mieux leur antigènes dans certaines conditions.

La perméabilisation quant à elle, doit être suffisante pour permettre l'accès de l'anticorps à sa protéine cible mais ne doit pas être trop importante pour éviter d'altérer les membranes. Différentes concentrations en Triton x-100 ont donc été testées (1% et 0,1%).

Nous avons testé 4 protocoles différents de fixation et de perméabilisation afin de mettre en évidence la cavéoline-1 par immunofluorescence dans les fibroblastes IMR-90 (tableau 2.2). Les cellules ont été repiquées sur lamelles 24 h après le stress à l' $H_2O_2$ , fixées le lendemain, c'est-à-dire 48 h après le stress. Les cellules ont été soumises à un double marquage : le noyau a été mis en évidence à l'aide du TOPRO-3. Ceux-ci apparaissent en bleu. La



	cellules contrôles	cellules stressées à l' $H_2O_2$
<b>Protocole 1</b> Fixation au <u>PFA 3%</u> et perméabilisation au <u>Triton x-100 1%</u>		
<b>Protocole 2</b> Fixation au <u>PFA 3%</u> et perméabilisation au <u>Triton x-100 0,1%</u>		
<b>Protocole 3</b> Fixation à l' <u>éthanol 96%</u> et perméabilisation au <u>Triton x-100 0,1%</u>		
<b>Protocole 4</b> Fixation et perméabilisation au <u>méthanol 80%/acétone 20%</u>		

**Tableau 3.1** : Comparaison des micrographies obtenues en microscopie confocale pour le marquage de la cavéoline-1 chez des fibroblastes IMR-90 contrôles et stressés à l' $H_2O_2$ , 48 h après le stress. Ces micrographies ont été obtenues par utilisation de quatre protocoles de fixation et de perméabilisation différents des cellules.

Les fibroblastes IMR-90 ont été soumis à un double marquage : le noyau a été mis en évidence à l'aide du TOPRO-3 (bleu), la cavéoline a été marquée par immunocytochimie (vert).

Colonne de gauche : cellules contrôles.

Colonne de droite : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .



cavéoline-1 a été marquée par immunocytochimie. Elle apparaît en vert. Cette convention sera utilisée pour la suite du mémoire (**tableau 3.1**).

#### **II.1.1 Résultats obtenus par utilisation du protocole 1 :**

(Fixation au PFA 3% et perméabilisation au Triton x-100 1%)

Nous pouvons observer pour les cellules contrôles nettement les noyaux, avec des parties plus sombres qui correspondent aux nucléoles. On devine le cytoplasme très légèrement marqué en bleu, ce qui ne devrait pas arriver puisqu'il ne contient pas d'ADN. Ce léger marquage est régulièrement observé pour ce type cellulaire. La cavéoline-1 est peu détectée, seuls quelques points sont observables dans le cytoplasme et dans le noyau. Les cellules stressées à l' $H_2O_2$  ont un marquage de la cavéoline-1 plus perceptible et ce tant au niveau du cytoplasme qu'au niveau nucléaire. Le marquage de la cavéoline-1 est diffus.

#### **II.1.2 Résultats obtenus par utilisation du protocole 2 :**

(Fixation au PFA 3% et perméabilisation au Triton x-100 0,1%)

Les résultats obtenus par l'utilisation de ce protocole sont assez semblables à ceux décrits ci-dessus. Les cellules contrôles présentent un léger marquage de la cavéoline-1 dans le cytoplasme et les noyaux. Notre protéine d'intérêt semble plus abondante dans les noyaux des cellules stressées ce qui est surprenant. Il n'y a pas de changement de localisation.

#### **II.1.3 Résultats obtenus par utilisation du protocole 3 :**

(Fixation à l'éthanol 96% et perméabilisation au Triton x-100 0,1%)

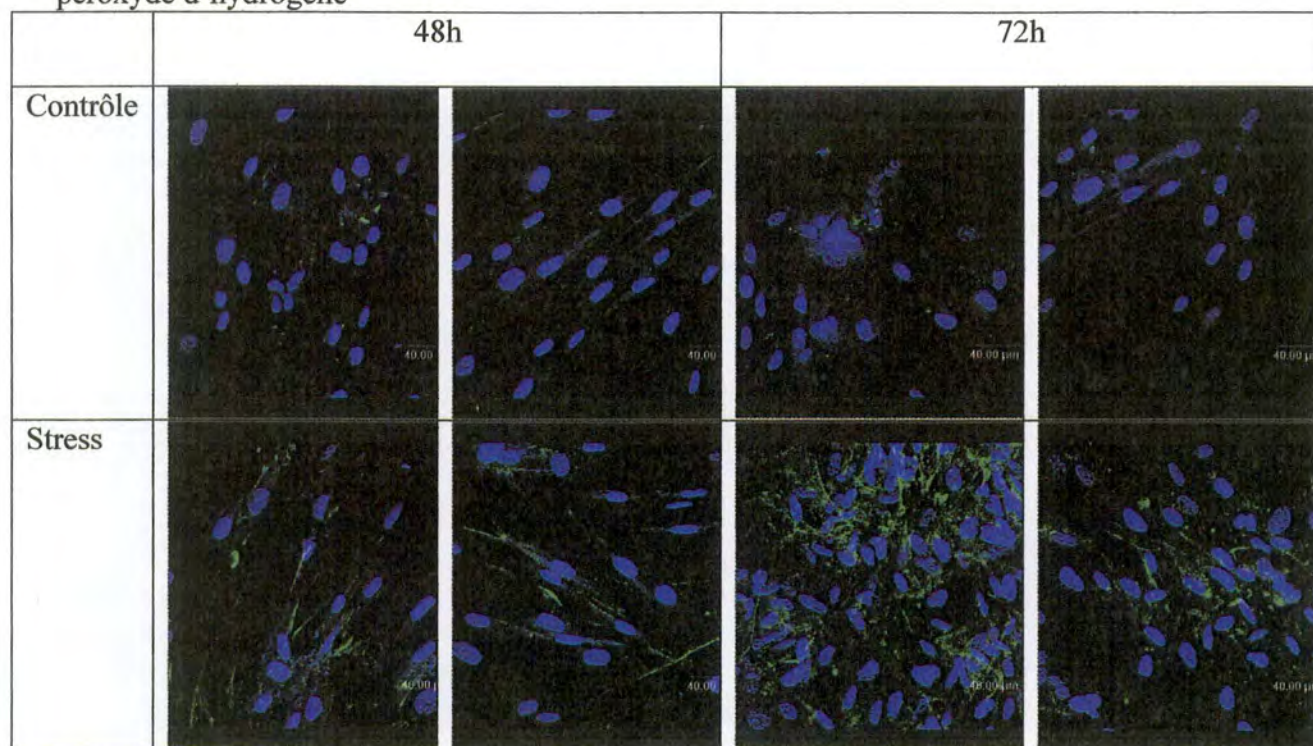
Le marquage au TOPRO 3 permet toujours de visualiser les noyaux en bleu. Les cellules contrôles fixées à l'éthanol et perméabilisées au Triton x-100 0,1% présentent un léger marquage de la cavéoline-1. On observe en effet de fines bandes vertes au niveau de la membrane plasmique. Un marquage plus diffus est visible au niveau du cytoplasme. Les cellules stressées possèdent un marquage plus important de la cavéoline-1, elle est détectable tout le long de la membrane plasmique. La largeur des constituants du réseau est plus importante que celle observée pour les cellules contrôles. Le marquage de cavéoline-1 au niveau du cytoplasme est également plus important dans les cellules stressées.

#### **II.1.4 Résultats obtenus par utilisation du protocole 4 :**

(Fixation et perméabilisation au méthanol 80%/acétone20%)

Les fibroblastes contrôles présentent un marquage plus important du cytoplasme par rapport aux cellules contrôles étudiées à l'aide des trois autres protocoles. La cavéoline-1 est visible à la fois sur des portions de la membrane plasmique et au niveau de quelques agrégats cytoplasmiques. Les cellules stressées à l' $H_2O_2$  présentent un marquage de la cavéoline-1 plus prononcé que les cellules contrôles. La cavéoline-1 forme un réseau dense tout le long de la membrane plasmique. Elle forme également des agrégats dans le cytoplasme, plus nombreux et de plus grande taille que ceux observés dans les cellules contrôles. Le marquage de la cavéoline-1 est globalement plus intense avec ce protocole par rapport au protocole qui utilise l'éthanol comme système de fixation et le Triton x-100 0,1% comme moyen de perméabilisation.

Marquage en immunofluorescence des fibroblastes IMR-90 48 et 72h après un stress au peroxyde d'hydrogène



**Tableau 3.2 :** Comparaison des micrographies obtenues en microscopie confocale pour le marquage de la cavéoline-1 chez des fibroblastes IMR-90 contrôles et stressés à l' $H_2O_2$  48h et 72h après le stress.

Les cellules ont été soumises à un double marquage : le noyau a été mis en évidence à l'aide du TOPRO-3 (bleu), la cavéoline a été marquée par immunocytochimie (vert).



### **II.1.5 Résumé des résultats obtenus par l'utilisation des 4 protocoles de fixation/perméabilisation pour l'analyse de la cavéoline-1 en marquage par immunofluorescence**

Les résultats obtenus avec les deux premiers protocoles sont assez comparables. La cavéoline-1 est présente dans le cytoplasme et les noyaux et son abondance y augmente dans les cellules stressées au peroxyde d'hydrogène.

Les deux derniers protocoles permettent d'obtenir un marquage différent à savoir un marquage de la cavéoline-1 au niveau de la membrane plasmique ainsi que des petits agrégats cytoplasmiques. Ce marquage est plus important dans les cellules stressées à l' $H_2O_2$  et concerne alors la quasi entièreté de la cellule. Par contre, le cytoplasme, n'est plus marqué de manière diffuse comme c'était le cas avec les protocoles qui utilisaient la PFA comme système de fixation. De même, le marquage des noyaux par la cavéoline-1 est absent.

En utilisant un seul anticorps spécifique de la cavéoline-1, nous montrons ici qu'il est possible d'observer des marquages différents en fonction du protocole de fixation/perméabilisation utilisé. Les deux premiers protocoles révèlent une localisation nucléaire de la cavéoline-1. Les deux autres semblent montrer une localisation membranaire de notre protéine d'intérêt. Or nous savons que la cavéoline-1 est décrite comme étant localisée dans les cavéoles ainsi qu'en membrane plasmique. Sa présence au niveau du cytoplasme et de l'appareil de Golgi est également connue. Nous nous posons donc la question de savoir si sa localisation nucléaire observée ici est un artéfact ou non. En effet, aucune donnée de la littérature ne mentionne une présence de la cavéoline-1 dans le noyau.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc choisi d'utiliser le troisième protocole de fixation/perméabilisation. En effet, c'est avec celui-ci que l'on observe le mieux la cavéoline au niveau membranaire.

### **II.2 Etude de la localisation subcellulaire de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène**

Des marquages en immunofluorescence ont été réalisés à 48 et 72 h après le stress au peroxyde d'hydrogène sur des fibroblastes IMR-90. Ces marquages visent à mettre en évidence la localisation subcellulaire de la cavéoline-1. Ils permettent également d'avoir un aperçu de l'abondance de la protéine. L'immunofluorescence a été réalisée en utilisant la technique de fixation et de perméabilisation choisie préalablement. Nous avons donc fixé les cellules à l'éthanol 96% et les avons perméabilisé à l'aide de Triton x-100 0,1%. Cette expérience a été réalisée une fois à 72 h et deux fois à 48 h. Les résultats obtenus sont semblables dans les deux expériences indépendantes (**tableau 3.2**).

Nous constatons pour les cellules contrôles fixées à l'éthanol et perméabilisées au Triton x-100 0,1% présentent un léger marquage de la cavéoline-1 sous forme de fine bandes le long de la membrane plasmique et de quelques agrégats au niveau du cytoplasme. Les noyaux sont toujours visibles en bleu grâce au marquage au TOPRO 3. Ces noyaux ne sont pas marqués par la cavéoline-1. Les cellules stressées au peroxyde d'hydrogène présentent un marquage de la cavéoline-1 plus important tout le long de la membrane plasmique. Les agrégats cytoplasmiques sont plus nombreux et plus importants que ceux observés dans les cellules contrôles.



À 72 h après le stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le marquage est plus important dans les cellules stressées à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et concerne alors la quasi totalité de la cellule.

Aucun changement de localisation de la cavéoline-1 n'a été observé entre les cellules contrôles et les cellules en SIPS induites par le peroxyde d'hydrogène. Quelles que soient les conditions (contrôle et stress), la cavéoline-1 est présente au niveau du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique.

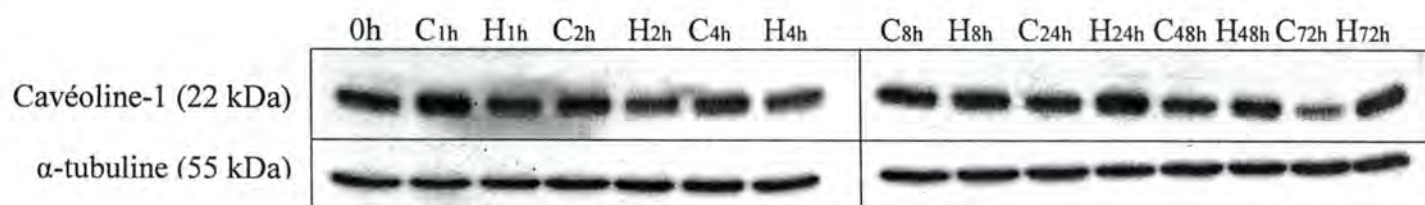
Des expériences complémentaires en Western blot ont ensuite été réalisées afin de déterminer l'abondance de la protéine dans des extraits cellulaires.

### **II.3 Etude des variations d'expression au niveau protéique de la cavéoline-1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène**

Pour rappel, une étude réalisée précédemment au laboratoire a montré que des fibroblastes IMR-90 soumis à un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  présentent une augmentation significative de l'abondance de la cavéoline-1 par rapport aux cellules contrôles à 24 h après le stress.

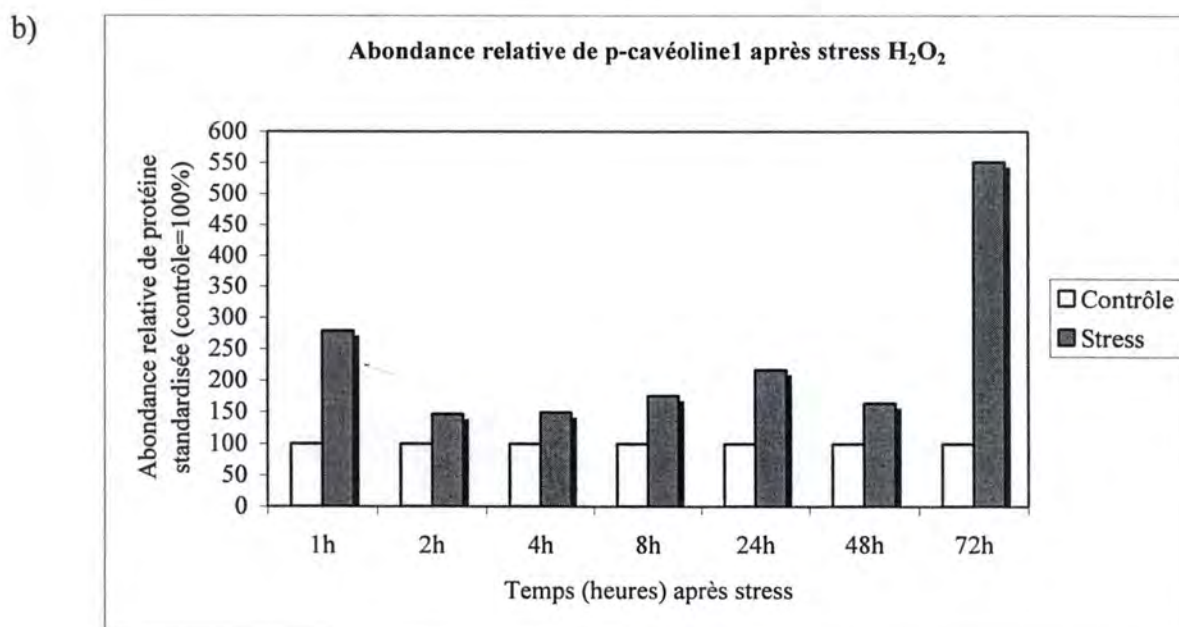
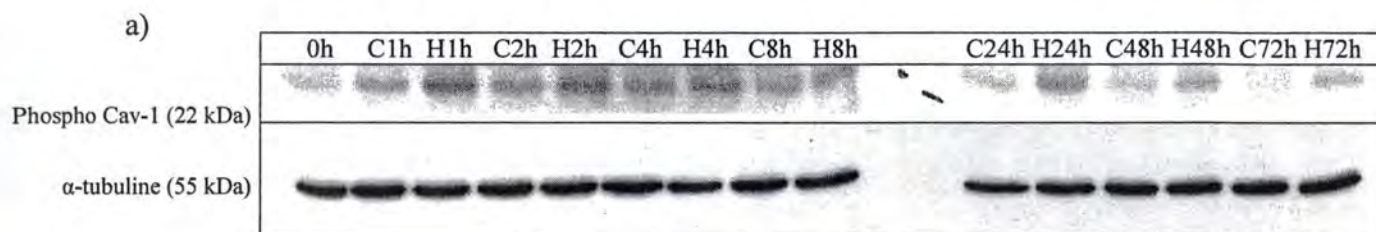
Lors de ce mémoire, les variations d'expression protéiques de la cavéoline-1 et de la cavéoline-1 phosphorylée sur la tyrosine 14 ont été étudiées à différents temps après un stress oxydatif subléthal au peroxyde d'hydrogène. Des extractions protéiques ont été réalisées aux temps suivants : 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h et 72 h après le stress pour des cellules stressées et des cellules contrôles de manière à voir plus clair dans le profil d'abondance de la cavéoline-1 après un stress sous  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figure 3.5 et 3.6).

On peut remarquer une diminution de l'abondance de la cavéoline-1 à 1, 2 et 4 h après le stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par rapport aux cellules contrôles. L'abondance de la cavéoline-1 est presque identique dans les cellules stressées et les cellules contrôles 8 h après le stress. Dans les temps plus longs, conformément aux résultats présentés précédemment, la quantité de cavéoline-1 augmente dans les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles à 24, 48 et 72 h après le stress. Il semble donc que l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules en SIPS induites par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  suit deux phases, d'abord une diminution et ensuite une augmentation. L'augmentation de la cavéoline-1 dans les temps longs est en concordance avec les observations réalisées en immunofluorescence.



**Figure 3.5 :** Détection de la cavéoline-1 par Western blot à différents temps après le stress sous  $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir d'extraits protéiques cellulaires obtenus à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress pour des fibroblastes IMR-90 contrôles (C) et stressés (H) à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme référence.





**Figure 3.6 :**

a) Détection de la phosphocavéoline-1 par Western blot à différents temps après le stress sous  $H_2O_2$  à partir d'extraits protéiques obtenus à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress pour des fibroblastes IMR-90 contrôles (C) et stressés (H) à l' $H_2O_2$ . L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme référence.

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant le niveau relatif d'expression protéique de la phospho-cavéoline-1 pour des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 h après le stress.

Les valeurs obtenues pour la phosphocavéoline-1 ont été normalisées par celles obtenues pour l' $\alpha$ -tubuline. Les abondances relatives de la phosphocavéoline-1 ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .

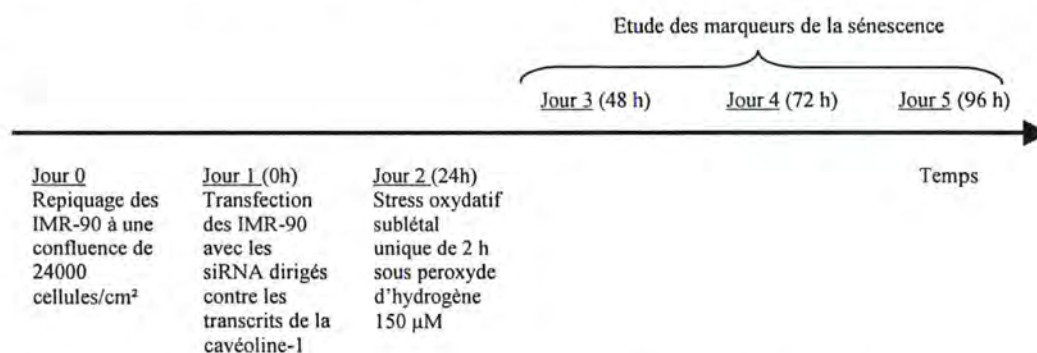
Nous nous sommes ensuite intéressé à la forme phosphorylée de la cavéoline-1. Nous pouvons observer sur la **figure 3.6** une augmentation de l'abondance de la phosphocavéoline-1 aux différents temps qui suivent le stress au peroxyde d'hydrogène. La cavéoline-1 semble donc être phosphorylée sur la tyrosine 14 après un stress à l' $H_2O_2$ . Cette phosphorylation se déroule à la fois dans les temps courts et longs après le stress et est maximale 72 h après celui-ci, par rapport aux cellules contrôles.

La détection de l'abondance protéique de  $p21^{WAF-1}$  nous a permis de vérifier que les cellules utilisées présentaient bien un phénotype de SIPS. Ainsi, on observe bien une induction de  $p21^{WAF-1}$  à 24, 48 et 72 h (voir figure 3.4).

### III. Utilisation des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1

L'utilisation de siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 nous a permis d'étudier l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition des marqueurs de la sénescence et dans l'activation de Rac1.

Différentes mises au point ont été nécessaires avant l'utilisation de ces siRNA chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par l' $H_2O_2$ . En effet, la concentration optimale en siRNA a du être déterminée de manière à obtenir une diminution maximale du niveau de transcrits de la cavéoline-1 tout en évitant les effets non spécifiques. De plus, la transfection ayant lieu la veille du stress, l'inhibition de la cavéoline-1 doit durer 96 h pour que l'étude des biomarqueurs de la sénescence puisse être réalisée (**figure 3.7**).



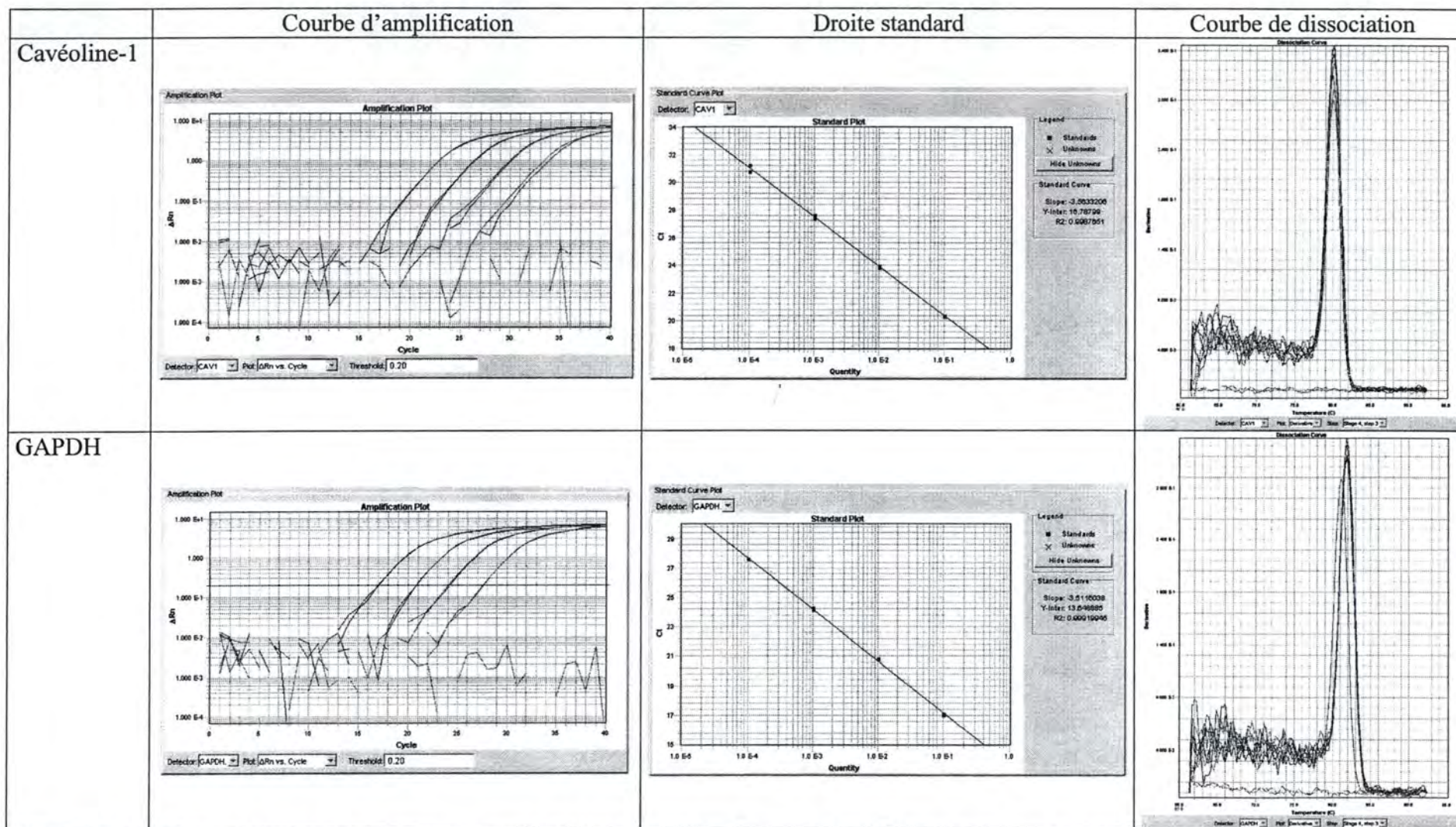
**Figure 3.7 :** Ligne du temps représentant les différentes étapes allant de la transfection des fibroblastes IMR-90 jusqu'à l'étude des marqueurs de la sénescence.

Un test de la durée d'action des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 a donc été réalisé par PCR en temps réel (niveau transcriptionnel) et Western blot (niveau protéique). La technique de PCR en temps réel nécessite quelques mises au point.

#### III.1 Mise au point des conditions de PCR en temps réel

Avant de pouvoir déterminer le niveau relatif de transcrits des gènes d'intérêt, quelques mises au point doivent être réalisées. Différentes concentrations de couples d'amorces sens et anti-sens doivent être testées. La concentration choisie est celle qui permet une amplification maximale en utilisant un minimum d'amorces, tout en évitant les dimères





**Figure 3.8 :** Tableau récapitulatif reprenant les courbes d'amplification des produits PCR ainsi que les droites standards et les courbes de dissociation pour la cavéoline-1 et la GAPDH.



d'amorces. Les concentrations optimales en amorces ont été déterminées dans une étude précédente réalisée au laboratoire. Les amorces sens et anti-sens ont donc été utilisées à des concentrations de 300/300 nM. L'établissement d'une droite standard pour le gène d'intérêt (cavéoline-1) et pour le gène de référence (GAPDH, glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase) permet de déterminer les efficacités de la PCR. Ces efficacités doivent être comparables pour pouvoir normaliser les résultats.

Le calcul de l'efficacité de la PCR nécessite l'établissement d'une droite standard pour le gène d'intérêt et pour le gène de référence. La droite standard correspond à la mesure du Ct (cycle seuil) en fonction du logarithme de l'inverse de la dilution. Cette droite s'établit en réalisant des dilutions de 10 en 10 de la quantité d'ADNc de départ. Ainsi, nous avons dilué l'ADNc de départ 10, 100, 1000 et 10000 fois puis réalisé la PCR en temps réel pour l'ADNc codant pour la cavéoline-1 et pour l'ADNc codant pour la GAPDH. Chacune des concentrations a permis de déterminer un nombre de cycles critiques propre à chaque ADNc. La pente de la droite standard est une fonction de l'efficacité de PCR, cette dernière pouvant être calculée par l'équation :

$$E = (\text{indice du logarithme})^{\frac{-1}{\text{pente}}} = \sqrt[pente]{\text{indice du logarithme}}$$

Il est nécessaire que les efficacités de la PCR pour l'ADNc de la cavéoline-1 et de la GAPDH soient proches l'une de l'autre et proches de 2 afin de pouvoir comparer l'amplification des deux gènes.

L'efficacité de la PCR pour l'ADNc de la cavéoline-1 est de :  $10^{-1/-3.560} = 1.9$ , celle de la GAPDH est de  $10^{-1/-3.351} = 1.9$ . Ces deux efficacités sont proches l'une de l'autre et proche de 2. On peut donc comparer l'amplification des deux gènes (**figure 3. 8**).

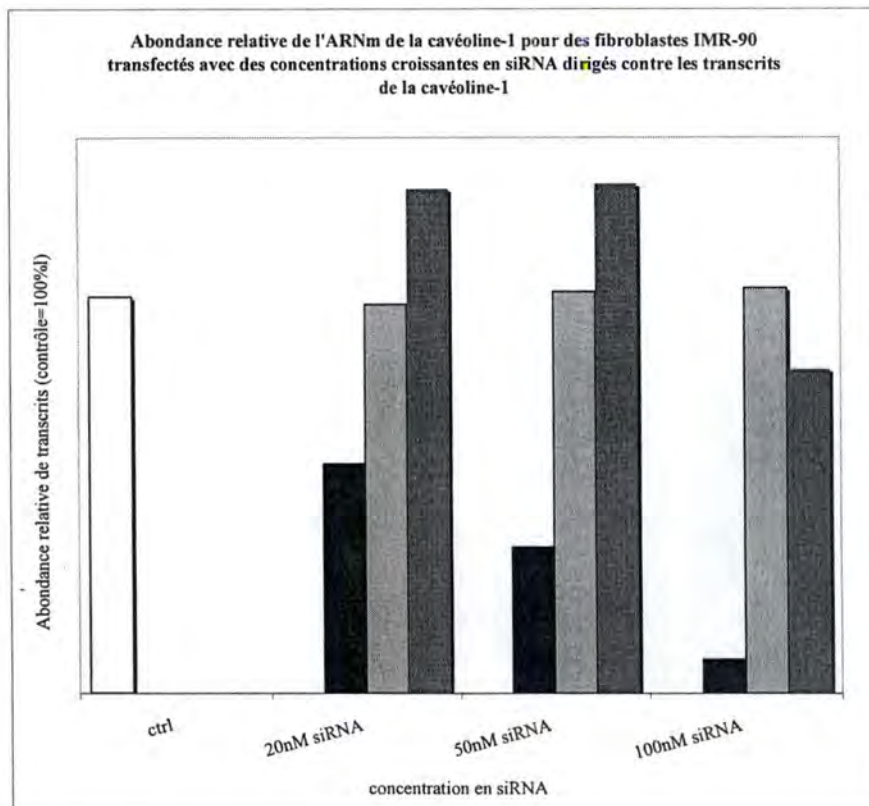
### **III.2 Mises au points de la transfection des IMR-90 avec des siRNA spécifiques des transcrits de la cavéoline-1**

#### **III.2.1 Détermination de la concentration optimale en siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1**

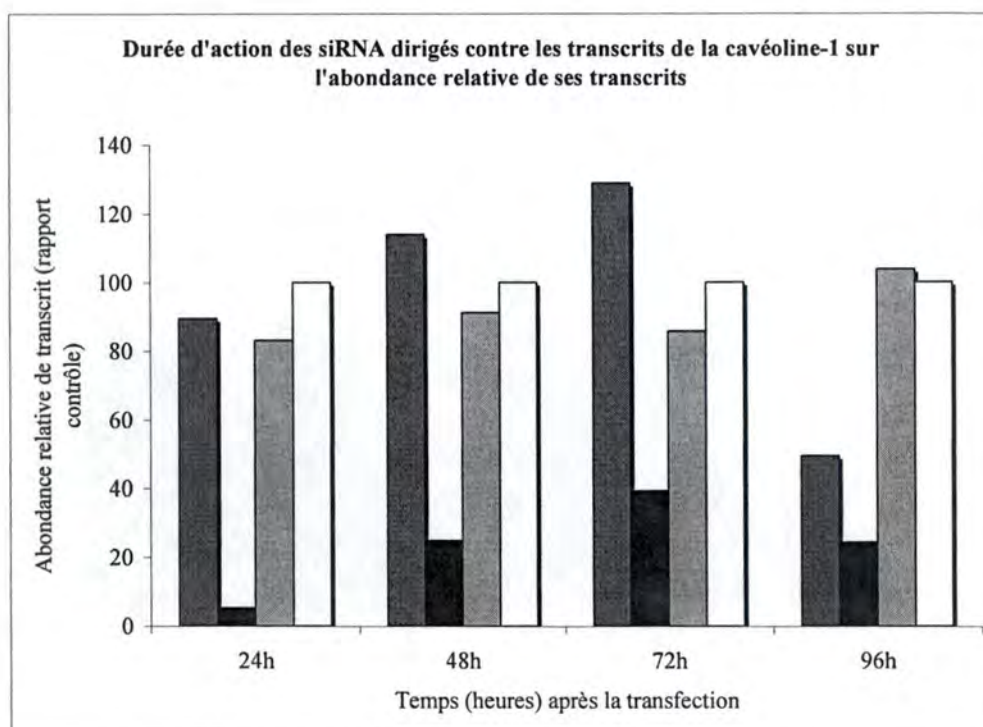
Des concentrations croissantes en siRNA, à savoir 20, 50 et 100 nM ont été utilisées pour transfecter les fibroblastes IMR-90 afin de déterminer la concentration optimale à utiliser. L'ARN total a été extrait à 24 h après la transfection. Ces extraits ont été réalisés pour des fibroblastes IMR-90 contrôles (non transfectés), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif et des fibroblastes IMR-90 mis en présence de l'agent transfectant, le Jetset. Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc. L'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 a été déterminée par PCR en temps réel pour les quatre conditions étudiées (**figure 3.9**).

On observe une diminution d'autant plus importante de l'abondance relative de l'ARNm de la cavéoline-1 que la concentration en siRNA utilisée augmente. Ainsi, l'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 diminue de 43%, 64% et 92% lorsque les cellules sont transfectées avec respectivement 20nM, 50nM et 100nM de siRNA. Nous observons de faibles variations de l'abondance relative de transcrits de l'ARNm de la cavéoline-1 dans les fibroblastes IMR-90 transfectés avec des siRNA qui ne reconnaissent





**Figure 3.9 :** Abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 en fonction des concentration en siRNA utilisées. Quatre conditions ont été étudiées :  
 Colonne blanche : fibroblastes IMR-90 non transfectés.  
 Colonnes noires : fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1.  
 Colonnes gris clair : fibroblastes IMR-90 transfectés avec un siRNA qui ne reconnaît aucune séquence dans le génome humain (contrôle négatif).  
 Colonnes gris foncé : fibroblastes IMR-90 mis en présence de l'agent transfectant, le Jetsi.  
 L'abondance relative de transcrits est rapportée à la valeur obtenue pour les fibroblastes IMR-90 contrôles.



**Figure 3.10 :** Abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 au cours du temps qui suit la transfection. Quatre conditions ont été étudiées :

Colonnes blanches : fibroblastes IMR-90 non transfectés.

Colonnes noires : fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1.

Colonnes gris clair : fibroblastes IMR-90 transfectés avec un siRNA qui ne reconnaît aucune séquence dans le génome humain (contrôle négatif).

Colonnes gris foncé : fibroblastes IMR-90 mis en présence de l'agent transfectant, le Jetset.

Le niveau relatif de transcrits est rapporté à la valeur obtenue pour les fibroblastes IMR-90 contrôles non transfectés.



aucune séquence dans le génome d'intérêt ou dans les fibroblastes IMR-90 mis en présence du Jetsi.

Pour la suite de cette étude, une concentration de 100nM en siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 sera donc utilisée. Cette concentration permet en effet de diminuer de manière importante le niveau d'ARNm de la cavéoline-1 tout en observant peu d'effets non spécifiques.

### **III.2.2 Détermination de la durée d'action des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1**

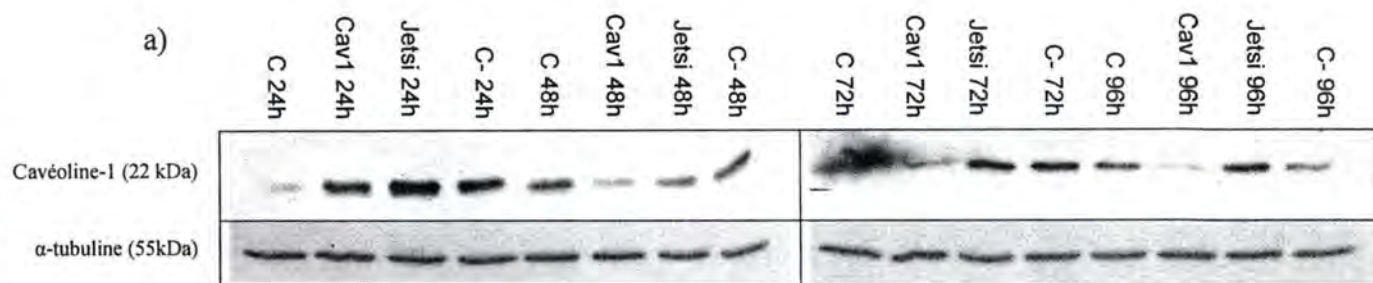
Pour rappel, la transfection a lieu la veille du stress, l'inhibition de la cavéoline-1 doit donc durer 96 h pour que l'étude des marqueurs de la sénescence puisse être réalisée avec et sans siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1. Des extractions de l'ARN total ont été réalisées à 24, 48, 72 et 96 h après la transfection pour des fibroblastes IMR-90 contrôles (non transfectés), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 (100 nM), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif et des fibroblastes IMR-90 mis en présence de l'agent transfectant. L'ARNm a ensuite été rétrotranscrit en ADNc. L'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 a été déterminée par PCR en temps réel pour ces quatre conditions.

Les résultats représentés par la **figure 3.10** nous indiquent que l'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 est diminuée de 94% dans les cellules transfectées avec 100nM de siRNA 24 h après la transfection. Au fil du temps qui suit la transfection, cette abondance de transcrits de la cavéoline-1 réaugmente de sorte que l'inhibition n'est plus que de 51% à 96 h après la transfection par rapport aux cellules mises en présence du Jetsi. Cette observation montre l'importance de réaliser un test de durée d'action des siRNA dans notre modèle. Les variations du niveau relatif des ARNm de cavéoline-1 dans les cellules contrôles, transfectées avec le contrôle négatif et mises en présence du Jetsi sont faibles, seule une augmentation à 96 h est observable, laissant penser que les effets non spécifiques au niveau transcriptionnel sont faibles.

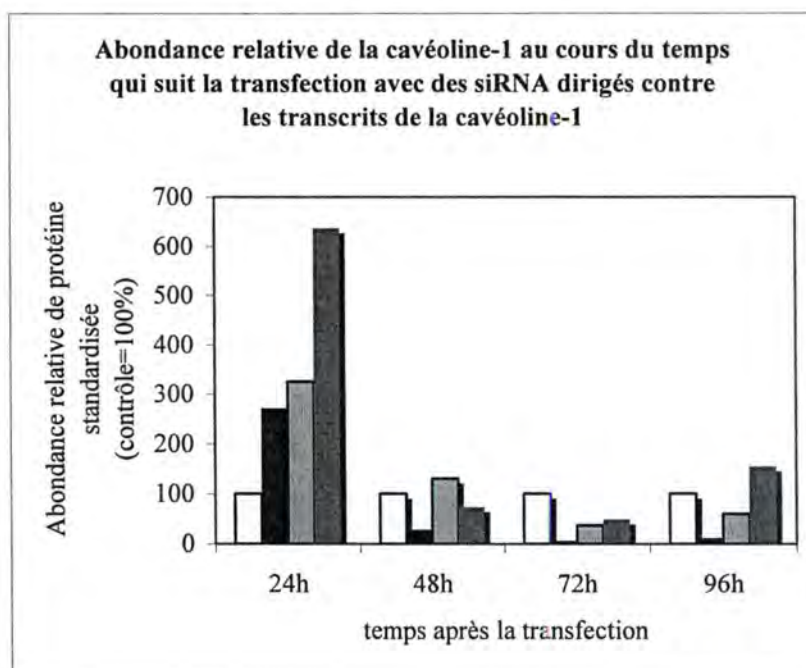
Puisque la protéine est l'acteur final au sein de la cellule, nous avons réalisé la même expérience en observant les effets des siRNA sur l'abondance protéique de la cavéoline-1.

Des extractions de protéines à 24, 48, 72 et 96 h après la transfection permettent de vérifier que la durée de l'action des siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 est suffisante pour réaliser l'étude des marqueurs de la sénescence. Les extractions ont eu lieu pour des cellules contrôles, des cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 (100nM), des cellules transfectées avec le contrôle négatif et des cellules mises en présence de l'agent transfectant (**figure 3.11**).

Les résultats obtenus après quantification et normalisation des valeurs suggèrent que 24 h après la transfection, les fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 présentent une diminution de l'abondance de la cavéoline-1 par rapport aux fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et aux fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif. On n'observe pas l'effet inhibiteur des siRNA entre les cellules transfectées et les cellules contrôles. Le temps nécessaire au turn-over de la cavéoline-1 dans les fibroblastes IMR-90 est peut-être supérieur à 24 h, expliquant ce résultat. Par contre, à 48, 72 et 96 h après la transfection, l'abondance relative de la cavéoline-1 est



b)



**Figure 3.11**

a) Détection de la cavéoline-1 par Western blot à différents temps après le stress sous  $H_2O_2$  à partir d'extraits protéiques obtenus à 24, 48, 72 et 96 h après la transfection. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme référence.

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant l'abondance relative de la cavéoline-1 pour des fibroblastes IMR-90 dans les quatre conditions étudiées à 24, 48, 72 et 96 h après la transfection.

Les valeurs obtenues pour la cavéoline-1 ont été normalisées par celle obtenues pour l' $\alpha$ -tubuline. Les abondances relatives de la cavéoline-1 ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonnes blanches : fibroblastes IMR-90 non transfectés.

Colonnes noires : fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1.

Colonnes gris clair : fibroblastes IMR-90 transfectés avec un siRNA qui ne reconnaît aucune séquence dans le génome humain (contrôle négatif).

Colonnes gris foncé : fibroblastes IMR-90 mis en présence de l'agent transfectant, le Jetsi.



diminuée de minimum 70% par rapport aux cellules contrôles. De plus les variations des contrôles (de transfection et contrôle négatif) sont faibles suggérant des effets non spécifiques peu importants. Nous pouvons également remarquer que l'abondance relative de la cavéoline-1 est élevée dans les fibroblastes transfectés à 24 h après la transfection par rapport aux fibroblastes non transfectés. Ces résultats pourraient être du à un effet de la transfection. En effet, celle-ci pourrait altérer les membranes. Ceci reste à vérifier.

Les études des abondances relatives en ARNm et en protéines de la cavéoline-1 réalisées en vue d'effectuer la transfection des fibroblastes IMR-90 avec des ARN interférents spécifiques des transcrits de la cavéoline-1 semblent prometteuses. En effet, les résultats suggèrent que la durée d'action de la transfection des siRNA est suffisante pour permettre l'étude des marqueurs de la sénescence.

### **III.3 Etude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition des marqueurs de sénescence**

En vue d'étudier l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition des marqueurs de la sénescence prématurée induite par un stress à l' $H_2O_2$  chez les fibroblastes IMR-90, nous avons transfecté des fibroblastes IMR-90 avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1. Le lendemain, les cellules ont été stressées pendant 2 h avec du peroxyde d'hydrogène 150  $\mu$ M. Les cellules ont ensuite été repiquées aux confluences souhaitées afin d'étudier l'apparition des marqueurs de la sénescence.

#### **III.3.1 Contrôle de transfection**

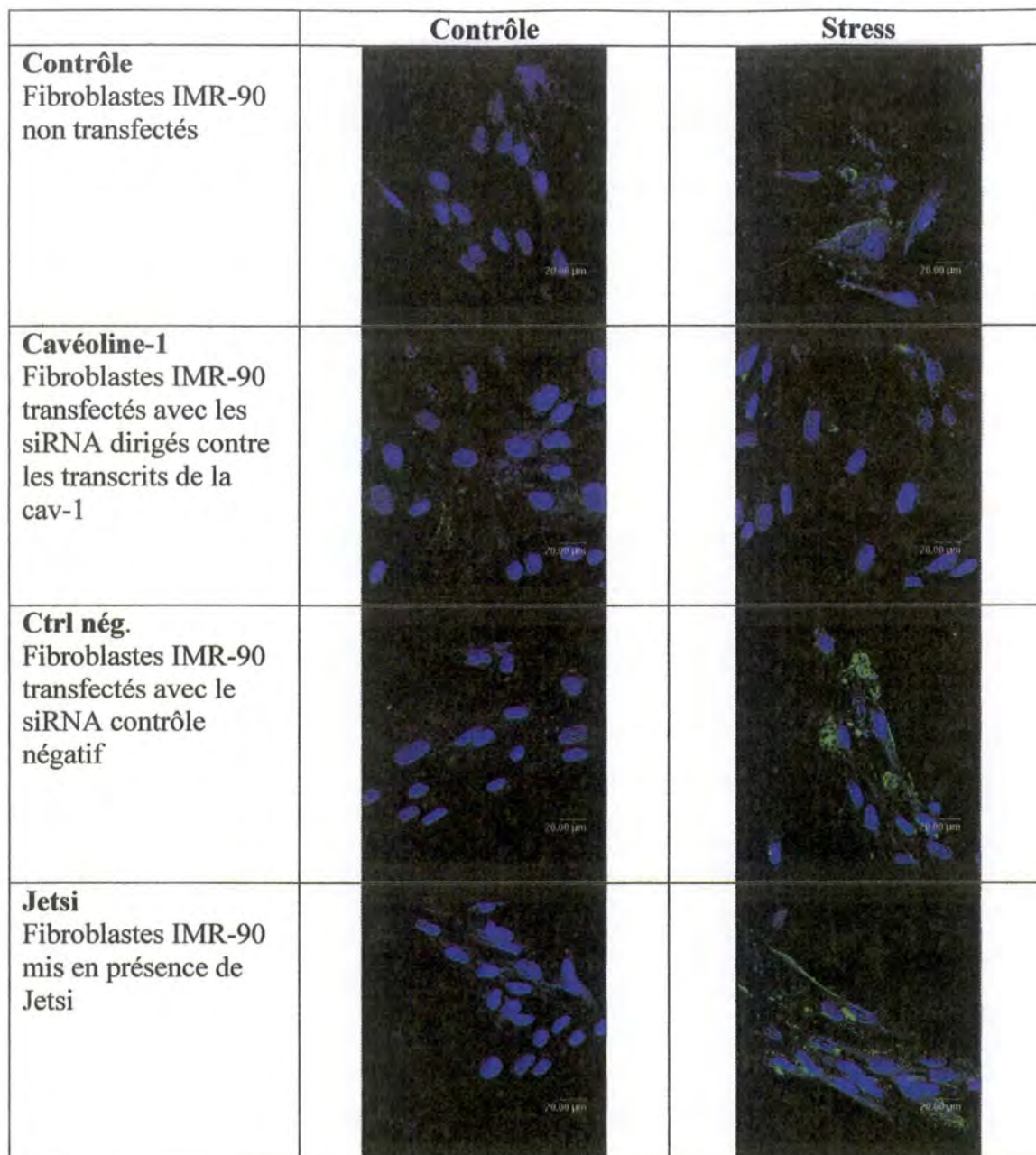
Un marquage en immunofluorescence de la cavéoline-1 et une analyse par Western blot de la cavéoline-1 ont été effectués parallèlement à l'étude des marqueurs de la sénescence afin de vérifier l'efficacité des transfactions. Ces vérifications ont été réalisées sur des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes mis en présence de Jetsi et des fibroblastes non transfectés et cela pour des cellules stressées ou non (**figure 3.12 et 3.13**).

Le marquage en immunofluorescence réalisé 48 h après le stress révèle une augmentation de l'abondance de la cavéoline-1 chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation n'est pas visible chez les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1. La transfection semble donc bien empêcher l'augmentation de l'abondance de la cavéoline-1 suite au stress.

Les extractions protéiques ont été réalisées à 48 h après le stress de 2 h sous peroxyde d'hydrogène à 150  $\mu$ M. L'abondance protéique relative de la cavéoline-1 a ensuite été analysée par Western-Blot. L'abondance relative de la cavéoline-1 est plus élevée dans les cellules stressées au peroxyde d'hydrogène que dans les cellules contrôles. Seules les cellules transfectées avec les siRNA dirigés contre les transcrits de cavéoline-1 et exposées à l' $H_2O_2$  voient leur abondance de cavéoline-1 rester identique entre les fibroblastes IMR-90 contrôles et les fibroblastes IMR-90 stressés.

Au vu de ces résultats, l'efficacité de la transfection semble suffisante pour poursuivre l'étude du rôle de la cavéoline-1 sur l'émergence des marqueurs de la sénescence.





**Figure 3.12 :** Contrôle de l'efficacité des transfections réalisées pour l'étude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition de marqueurs de la sénescence. Ce contrôle a été réalisé pour des IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés et cela pour des cellules stressées ou non. Comparaison des micrographies obtenues en microscopie confocale pour des fibroblastes IMR-90 soumis à un stress oxydatif sublé unique de 2 h sous peroxyde d'hydrogène 150 µM à 48 h et 72 h après le stress.

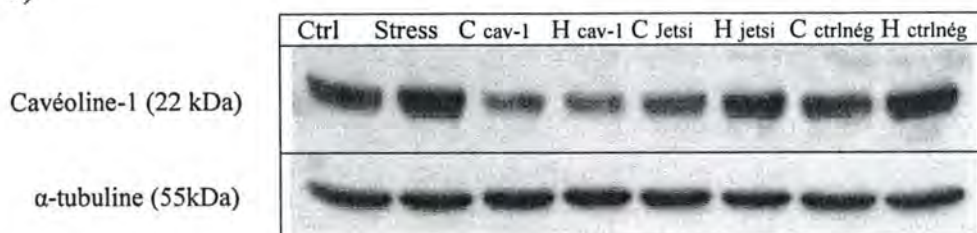
Les cellules ont été soumises à un double marquage : le noyau a été mis en évidence à l'aide du TOPRO-3 (bleu), la cavéoline a été marquée par immunocytochimie (vert).

Colonne de gauche : cellules contrôles.

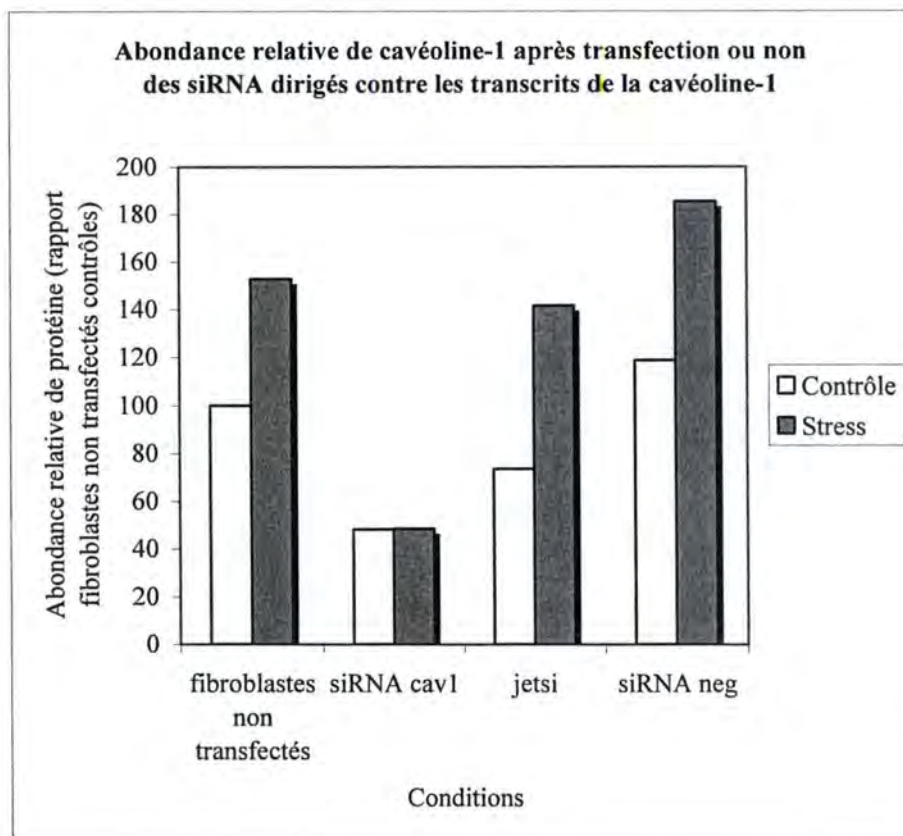
Colonne de droite : cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



a)



b)



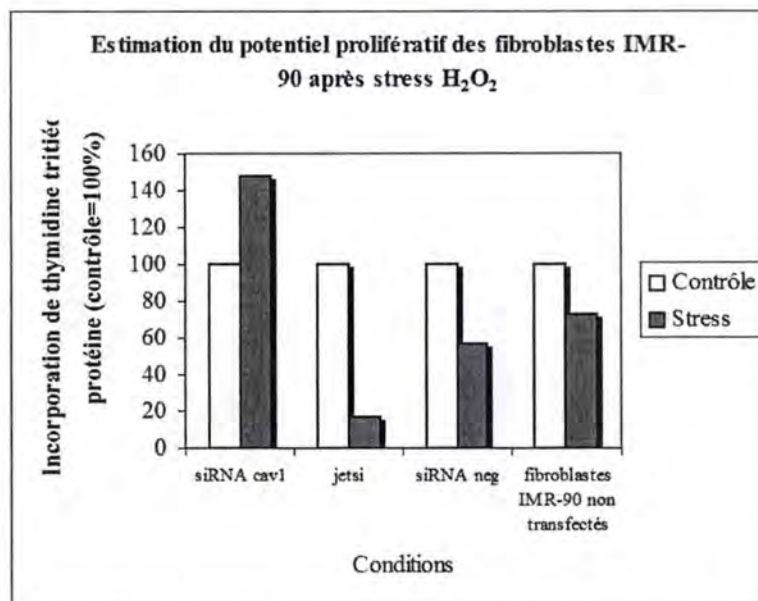
**Figure 3.13:** Contrôle de l'efficacité des transfections réalisées pour l'étude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition de marqueurs de la sénescence. Ce contrôle a été réalisé pour des IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés et cela pour des cellules stressées ou non.

a) Détection de la cavéoline-1 par Western blot à partir d'extraits cellulaire protéiques obtenus à 48 h après le stress pour des fibroblastes IMR-90 contrôles (C) et stressés (H) à l' $H_2O_2$ . L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme référence.

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant l'abondance relative de la cavéoline-1 pour des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées 48 h après le stress. Les valeurs obtenues pour la cavéoline-1 ont été normalisées par celles obtenues pour l' $\alpha$ -tubuline. Les abondances relatives de la cavéoline-1 ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles.

Colonnes blanches : cellules contrôles.

Colonnes grises : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .



**Figure 3.14 :** Estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes IMR-90 dans les deux conditions étudiées (fibroblastes contrôles et stressés à l' $H_2O_2$ ) en fonction des différentes conditions de transfection. (fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés). La mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée a été réalisée entre 48 et 72 h après le stress à l' $H_2O_2$ . Ces résultats ont été normalisés par la quantité de protéines présentes dans les huit conditions au départ de l'expérience. Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles non transfectées.

Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .



### III.3.2 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur le potentiel prolifératif

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'arrêt du cycle cellulaire est une des caractéristiques principales des cellules en SIPS et en sénescence répllicative. Le potentiel prolifératif peut être étudié en suivant l'incorporation de thymidine tritiée et peut également être mis en évidence par le suivi de l'abondance relative de l'inhibiteur de CDK/cycline : p21<sup>WAF-1</sup>. De manière à mettre en évidence le rôle potentiel de la cavéoline-1 dans l'arrêt du potentiel prolifératif des fibroblastes IMR-90 nous avons mesuré l'incorporation de la thymidine tritiée entre 48 et 72 h après le stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et suivi l'abondance protéique relative de p21<sup>WAF-1</sup> à 48 h après le stress.

#### a) Incorporation de la thymidine tritiée

Nous avons tout d'abord mesuré l'incorporation de thymidine tritiée sur des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés. Ceci a été réalisé pour des cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des cellules contrôles dans les quatre conditions. Cette étude a fait l'objet de deux expériences indépendantes qui ont donné des résultats similaires (figure 3.14).

Le potentiel prolifératif des cellules stressées au peroxyde d'hydrogène est diminué par rapport aux cellules contrôles dans toutes les conditions excepté lorsque les fibroblastes IMR-90 sont transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1. Cette diminution du potentiel prolifératif est moins importante par rapport à ce qui est normalement observé dans la sénescence induite par un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La confluence des fibroblastes IMR-90 au moment du stress pourrait expliquer ce résultat. Toutefois, ces résultats suggèrent que la capacité de synthèse de l'ADN de ces cellules semble être altérée. Il est intéressant de remarquer que les fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les ARNm de la cavéoline-1 présentent un potentiel prolifératif plus élevé que les fibroblastes IMR-90 contrôles. L'augmentation du potentiel prolifératif est de 1,5 fois. Ainsi, l'inhibition de la cavéoline-1 préviendrait l'arrêt du cycle cellulaire, un marqueur important de la SIPS. De plus, cette inhibition semblerait favoriser même la prolifération cellulaire.

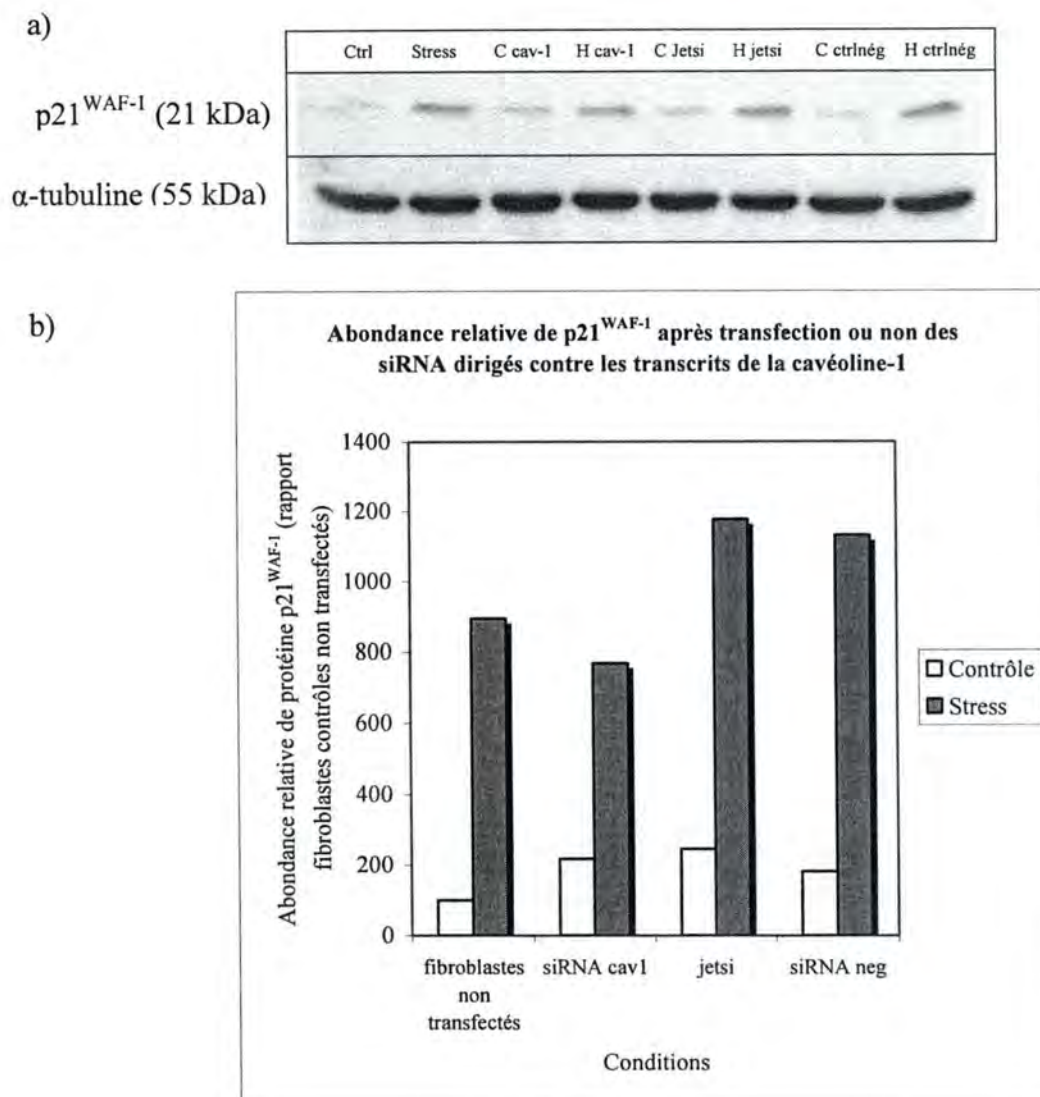
#### b) Niveau d'expression protéique de l'inhibiteur de CDK/cycline: p21<sup>WAF-1</sup>

L'expression de p21<sup>WAF-1</sup> a été étudiée par Western blot pour des extraits protéiques obtenus 24 h après le stress au peroxyde d'hydrogène. Les 8 conditions sont identiques à celles décrites pour le test d'incorporation de la thymidine tritiée (figure 3.15).

Les résultats obtenus indiquent une augmentation de l'expression de p21<sup>WAF-1</sup> dans les cellules stressées à la fois dans les fibroblastes transfectés avec le siRNA contrôle négatif, les fibroblastes mis en présence du Jetsi, les fibroblastes transfectés avec les siRNA dirigés contre les ARNm de la cavéoline-1 et les fibroblastes contrôles. Toutefois, la différence relative d'abondance protéique de p21<sup>WAF-1</sup> entre les fibroblastes contrôles et stressés transfectés avec les siRNA est moins importante.

Au vu de ces résultats, il semble que l'augmentation du potentiel prolifératif observé pour les cellules stressées et transfectées avec les siRNA dirigés contre les ARNm de la cavéoline-1 soit liée du moins en partie à une diminution de l'abondance de p21<sup>WAF-1</sup>.





**Figure 3.15 :**

a) Détection de p21<sup>WAF-1</sup> par Western blot après le stress sous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir d'extraits protéiques obtenus à 48 h après le stress. L'α-tubuline est utilisée comme référence. Cette étude a été réalisée pour des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 (cav-1), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif (ctrlég), des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi (jetsi) et des fibroblastes IMR-90 non transfectés.

b) Quantification des différentes bandes obtenues par Western-Blot montrant l'abondance relative de p21<sup>WAF-1</sup>. Les conditions contrôle (C) et stress (H) sont étudiées à 48 h après le stress. Cette étude a été réalisée pour des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés.

Les valeurs obtenues pour p21<sup>WAF-1</sup> ont été normalisées par celles obtenues pour l'α-tubuline. Les abondances relatives de p21<sup>WAF-1</sup> ont ensuite été rapportées aux valeurs obtenues pour les fibroblastes contrôles non transfectés.

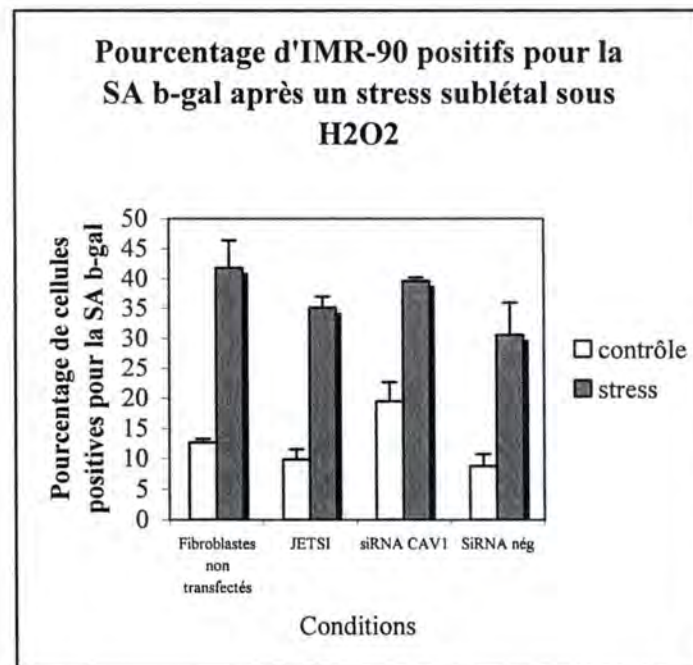
Colonne blanche : cellules contrôles.

Colonne grise : cellules stressées à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### III.3.3 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur l'activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence

À 72h après le stress, nous avons analysé le pourcentage de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -Gal dans nos quatre conditions de transfection (**figure 3.16**). Nous pouvons observer une forte augmentation, environ 2 fois, de la proportion de cellules positives pour l'activité SA  $\beta$ -Gal entre les cellules contrôles et les cellules stressées pour ces 4 conditions. De plus, une légère augmentation de l'activité SA  $\beta$ -Gal pour les fibroblastes contrôles transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 est détectable.



**Figure 3.16 :** Pourcentage de fibroblastes IMR-90 positifs pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence dans les deux conditions étudiées (fibroblastes contrôles et fibroblastes stressés à l' $H_2O_2$ ). L'étude a été effectuée pour des fibroblastes contrôles (non transfectés), des fibroblastes transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes transfectés avec le contrôle négatif et des fibroblastes mis en présence de l'agent transfectant.

Colonne blanche : cellules contrôles

Colonne grise : cellules stressées à l' $H_2O_2$ .

Nos résultats indiquent qu'une diminution de l'abondance relative de la cavéoline-1 par utilisation de siRNA ne semble pas affecter l'activité SA  $\beta$ -Gal dans les cellules stressées.

### III.4 Etude de l'implication de la cavéoline-1 sur l'activation de Rac1 chez les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène

Une étude effectuée au laboratoire sur des fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurément induite par l' $H_2O_2$  a révélé une activation de Rac1 et de Cdc42 essentiellement à 24 h après le stress.

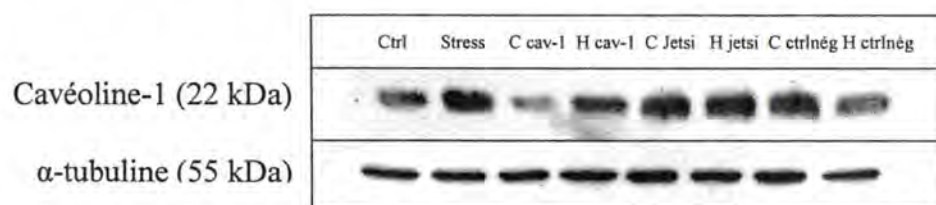


En présence de siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, nous avons voulu savoir si la cavéoline-1 jouait un rôle au niveau de l'activation de Rac1 chez les fibroblastes IMR-90 stressés. Nous avons donc étudié l'abondance relative de Rac1 lié au GTP sous différentes conditions : fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1, des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif, des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi et des fibroblastes IMR-90 non transfectés.

### III.4.1 Contrôle de transfection

Tout d'abord, un contrôle de l'efficacité de la transfection a été analysé en mettant en évidence l'abondance de la cavéoline-1 par Western blot pour chaque condition. Pour cela, les fibroblastes ont été transfectés. Le lendemain de la transfection, les fibroblastes IMR-90 ont été stressés pendant 2 h avec du peroxyde d'hydrogène à 150  $\mu$ M. À 24 h après ce stress, les cellules ont été lysées selon le protocole décrit au point V.1 du Matériel et Méthodes concernant la détection de Rac1 active. Une partie des extraits a été utilisée pour la purification de Rac1 active, l'autre pour mettre en évidence l'abondance relative de la cavéoline-1 et la forme totale de Rac1.

Nous pouvons observer à la **figure 3.17**, une augmentation importante de l'abondance relative de la cavéoline-1 pour les fibroblastes stressés. Cette augmentation est la plus faible dans les cellules transfectées avec les ARN interférents dirigés contre les ARNm de la cavéoline-1. L'efficacité des siRNA sur l'abondance relative de la cavéoline-1 étant peu élevée, l'effet potentiel de l'implication de la cavéoline-1 sur l'activation de Rac1 risque d'être peu marqué. Nous avons néanmoins utilisé ces extraits afin d'étudier l'effet du blocage de production de cavéoline-1 sur l'activation de Rac1. Ces résultats sont donc préliminaires et devront être renouvelés.



**Figure 3.17** : Contrôle de l'efficacité des transfections réalisées pour l'étude de l'implication de la cavéoline-1 dans l'activation de Rac1. Ce contrôle a été réalisé pour des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 (cav-1), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif (ctrlnég), des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi (jetsi) et des fibroblastes IMR-90 non transfectés et cela pour des cellules stressées (H) ou non (C).

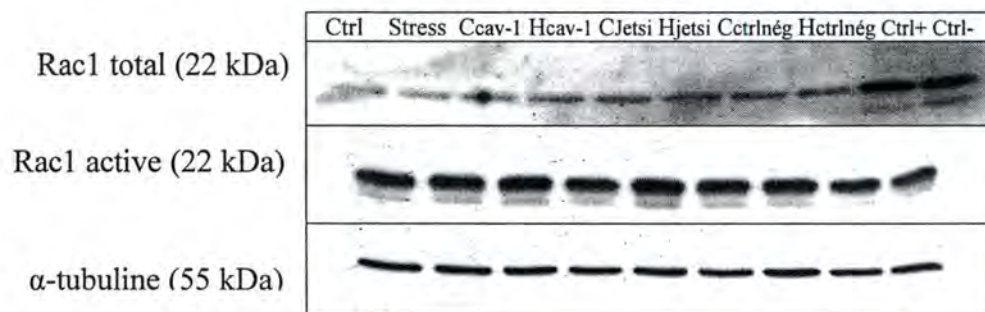
### III.4.2 Effet de l'inhibition de la cavéoline-1 sur l'abondance relative de Rac1 actif dans les fibroblastes IMR-90 en SIPS induite par le peroxyde d'hydrogène

L'effet de l'inhibition de la cavéoline-1 sur l'abondance relative de Rac1 active dans les fibroblastes IMR-90 en sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène a été étudiée dans les conditions précitées (**figure 3.18**). Les résultats obtenus nous indiquent que l'abondance relative de Rac1 active est légèrement augmentée dans les fibroblastes stressés à l' $H_2O_2$  24 h après ce stress. Après quantification, cette augmentation est plus légère que ce qui avait été observé dans les expériences précédentes réalisées au laboratoire, et avait été



quantifié comme augmentant de 2 à 3 fois. Remarquons que le lysat cellulaire traité avec du GDP en vue de réaliser un contrôle négatif présente une bande bien visible sur l'autoradiographie. Le traitement ne semble donc pas avoir été efficace. L'abondance relative de Rac1 total ne varie pas entre les différentes conditions étudiées. Ceci est corrélé avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire.

Dans ces conditions de faible activation de Rac1, il est difficile de tirer une conclusion quant à l'effet des siRNA sur cette activation. Ces résultats préliminaires doivent être reproduits en maîtrisant mieux la délicate estimation de l'abondance de Rac1 active.



**Figure 3.18**

Détection de Rac1 active totale par Western blot 24 h après le stress sous  $H_2O_2$  à partir d'extraits protéiques obtenus 24 h après le stress. L' $\alpha$ -tubuline est utilisée comme référence. Cette étude a été réalisée pour des fibroblastes IMR-90 transfectés avec les siRNA dirigés contre les transcrits de la cavéoline-1 (cav-1), des fibroblastes IMR-90 transfectés avec le contrôle négatif (ctrlnég), des fibroblastes IMR-90 mis en présence de Jetsi (jetsi) et des fibroblastes IMR-90 non transfectés et cela pour des cellules stressées (H) ou non (C).

# Conclusions et perspectives



## **Cinquième partie : Conclusions et perspectives**

Au cours de leurs divisions successives, les fibroblastes diploïdes humains en culture acquièrent progressivement des marqueurs de la sénescence répllicative tel qu'une morphologie plus étalée, une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, un arrêt du cycle cellulaire ou encore la modification du niveau d'expression de nombreux gènes, etc. Une simple exposition de fibroblastes diploïdes humains à une dose sublétalement d' $H_2O_2$  permet d'induire leur sénescence prématurée 3 jours après ce stress. Ce phénotype est appelé sénescence induite prématurément par un stress (SIPS).

Au cours de ce mémoire, nous avons analysé quelques marqueurs de la SIPS dans des fibroblastes IMR-90 stressés durant 2 heures avec une concentration sublétalement d' $H_2O_2$ . Comme il a déjà été décrit pour ce modèle, nous avons observé une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence ainsi qu'une nette réduction du potentiel prolifératif à 72 heures après le stress. De plus, nous avons observé une augmentation du niveau protéique de p21<sup>WAF-1</sup>, et ce dès 4h après le stress  $H_2O_2$ . Puisque ces marqueurs étaient bien observés, nous avons donc poursuivi notre étude de la SIPS.

Dans ce modèle étudié, nous savions déjà au laboratoire (thèse de Aline Chrétien) que Rac1 est activée à partir de 8 heures après le stress avec un pic d'activité à 24 heures après le stress. Cette activation permettrait d'expliquer la morphologie étalée des cellules en SIPS. En effet, Rac1 est connue pour être impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, Rac1 pourrait être responsable de l'activation de p38<sup>MAPK</sup>, déjà décrite comme étant impliquée dans l'apparition de la SIPS des fibroblastes IMR-90. Cependant, nous ne savons pas quels sont les mécanismes responsables de l'activation de Rac1. Sur base des données de la littérature, plusieurs pistes ont été sélectionnées afin de vérifier leur implication dans l'activation de Rac1 et Cdc42.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la cavéoline-1 dans le cadre de la SIPS induite par  $H_2O_2$  chez les fibroblastes IMR-90. Cette protéine est un constituant essentiel des cavéoles. Les cavéolines-1 sont impliquées dans un large éventail d'événements cellulaires et sont un des centres importants de coordination de transduction du signal. En fonction du stimuli ou des conditions environnementales cellulaires, de nombreuses protéines interagissent avec la cavéoline-1, par exemple Rac1.

Durant ce travail, nous avons, d'une part, montré que l'abondance relative de la cavéoline-1 augmente dans les temps longs qui suivent le stress  $H_2O_2$ . Nous avons montré que cette augmentation a lieu dès 4 heures après le stress. Une étude préliminaire à ce mémoire avait démontré que l'abondance relative de transcrits de la cavéoline-1 ne varie pas à 4, 8, 24, 48 et 72 heures après le stress  $H_2O_2$ . Ceci signifie donc qu'il existe des régulations après la transcription. En 2002, d'autres chercheurs ont démontré que la cavéoline-1 induisait la sénescence dans des fibroblastes murins stressés à l' $H_2O_2$  (Volonte *et al.*, 2002). Ils ont observé une augmentation de l'abondance de cette protéine uniquement après 3 jours qui suivent le stress. Dans notre modèle, la cavéoline pourrait donc jouer un rôle supplémentaire, à savoir induire des voies de transduction dans les 4 heures qui suivent le stress. Nous pensons évidemment à Rac1, puisque cette protéine doit être transloquée près de la membrane plasmique pour être activée.



Nous avons poursuivi cette étude en utilisant des siRNA permettant de bloquer la synthèse de la cavéoline-1. Nous avons tout d'abord réalisé les mises au point nécessaires à l'utilisation de cet outil dans nos cellules. Puisque nous avons obtenu des résultats satisfaisants, nous avons alors étudié l'implication de la cavéoline-1 dans l'apparition de quelques marqueurs de la sénescence. Nous avons réalisé deux expériences indépendantes pour lesquelles nous avons étudié le potentiel prolifératif et l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence des fibroblastes IMR-90 dépourvus de cavéoline-1 ou non. Nous avons comparé ces marqueurs pour des cellules soumises à un stress subléthal à l' $H_2O_2$  et pour des cellules contrôles. Des fibroblastes IMR-90 uniquement placés en présence de l'agent stressant ou transfectés avec un siRNA négatif ont également été analysés après le stress  $H_2O_2$  ou non. Les résultats obtenus pour les 2 expériences sont assez similaires. Cette expérience sera reproduite de manière à obtenir des résultats ayant un poids statistique satisfaisant. Cependant, nous pouvons déjà tirer quelques conclusions de cette étude. Après le stress  $H_2O_2$ , il semble que l'inhibition de la synthèse de cavéoline-1 n'atténue pas l'augmentation de la proportion de fibroblastes IMR-90 positifs pour l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Par contre, la cavéoline-1 pourrait être nécessaire au blocage du cycle cellulaire en phase G1/S des fibroblastes IMR-90 stressés avec de l' $H_2O_2$ . Ce mécanisme semblerait peut être dépendant de la voie de p21<sup>WAF-1</sup> puisque la différence d'abondance de cette protéine entre fibroblastes contrôles et stressés est moins évidente en présence de siRNA. Néanmoins, nous devons tenir compte de deux points essentiels. Premièrement, la diminution de cavéoline-1 dans les fibroblastes IMR-90 transfectés avec le siRNA n'était pas totale. Il est donc logique de penser que les effets observés dans ces études étaient donc moins importants également. Deuxièmement, lors des mises au point de la technique des siRNA, nous avons réalisé que le turn-over de la cavéoline-1 semble être assez lent dans les fibroblastes IMR-90. En effet, nous avons observé une diminution progressive d'abondance de cavéoline-1 au cours du temps qui suivait la transfection des fibroblastes avec les siRNA. Il serait donc nécessaire d'analyser son abondance dans les heures qui suivent le stress à l' $H_2O_2$  afin de voir si les effets observés ici sont liés à une inhibition de production de cavéoline-1 uniquement dans les temps longs qui suivent ce stress. Nous pouvons donc poser comme hypothèse que la cavéoline-1 est partiellement impliquée dans l'apparition de la sénescence prématurée des fibroblastes IMR-90 induite par l' $H_2O_2$ . Nous sommes en effet conscients qu'un phénotype tel que la SIPS doit être induit via l'implication de nombreux effecteurs. Certains d'entre eux sont activés directement après le stress, d'autres le sont à plus long terme.

Ces observations sont en accord avec des données récoltées dans la littérature. Ainsi, une étude réalisée par Galbiati et son équipe a montré que la surexpression temporaire de la cavéoline dans des cellules murines NIH 3T3 ou la surexpression de la cavéoline dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) est suffisante pour induire un arrêt du cycle cellulaire entre la phase G<sub>1</sub> et S. Cet arrêt du cycle cellulaire est médié par la voie de transduction du signal dépendante de p21 et p53. En effet, p53 est activé dans les cellules qui surexpriment la cavéoline et p21 est induit. Volonte et son équipe ont montré que la quercétine empêche l'augmentation de la cavéoline suite à un stress à l' $H_2O_2$ . Or la quercétine n'empêche que partiellement l'activation de p53. L'activation de p53 suite à un stress à l' $H_2O_2$  serait donc dépendante de deux voies, l'une dépendante de la cavéoline-1 et l'autre non (Volonte *et al.*, 2002). De plus, Razani et son équipe ont montré que p53 est un régulateur positif de la transcription du gène de la cavéoline (Razani *et al.*, 2000). La cavéoline-1 et p53 agirait donc en synergie.

Dans d'autres études, une réduction ciblée de la cavéoline permettrait la sortie des cellules de la phase G0/G. L'utilisation de protéines recombinantes de la cavéoline a permis



de montrer l'importance du domaine « scaffolding » de la cavéoline-1 dans l'arrêt en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Les fibroblastes murins qui surexpriment la cavéoline-1 voient leur potentiel prolifératif diminuer par rapport aux fibroblastes murins ayant un niveau normal d'expression de cette protéine (Volonte *et al.*, 2002). Ils ont également observé une réduction de la réplication de l'ADN (Galbiati *et al.*, 2001). Le rôle de la cavéoline-1 dans l'inhibition de contact des fibroblastes NIH3T3 a été démontré (Galbiati *et al.*, 1998). L'expression de la cavéoline-1 jouerait donc un rôle critique dans la modulation de la progression du cycle cellulaire.

Dans ce travail, nous avons également montré que la phosphorylation de la cavéoline-1 augmente à 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72 heures après le stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une autre étude révèle que lorsque les cellules sont attachées à leur substrat, la forme phosphorylée de la cavéoline-1 est retenue dans les plaques d'adhésions focales où elle pourrait jouer un rôle. Ils ont montré que la cavéoline-1 est associée aux complexes d'adhésions focales par interaction avec les intégrines. De plus, la cavéoline-1 phosphorylée semblerait contrôler l'activité de la kinase des adhésions focales (FAK). Il y a une augmentation significative de la formation des fibres de stress d'actine et des plaques d'adhésions focales dans les cellules sénescents. Si les cellules se détachent, cette isoforme phosphorylée migre vers les cavéoles et y est internalisée. Or, nous savons que les cellules en SIPS présentent un potentiel prolifératif diminué, les cellules adhèrent donc mieux à leur substrat. En perspective de notre travail, l'étude par microscopie confocale de la forme phosphorylée de la cavéoline-1 permettrait de déterminer s'il y a ou pas changements de localisation subcellulaire de cette isoforme au cours du temps qui suit le stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les fibroblastes IMR-90.

L'étape suivante était d'étudier le rôle potentiel de la cavéoline-1 sur l'activation de Rac1 dans notre modèle. L'expérience a été réalisée une seule fois, ceci doit donc être reproduit dans de meilleures conditions. Il a déjà été démontré dans des fibroblastes de peau que Rac1 peut interagir directement avec la cavéoline-1 lorsque les cellules sont sénescents (Cho *et al.*, 2004). Ceci expliquerait alors par quel mécanisme la cavéoline-1 pourrait être impliquée dans l'apparition de la SIPS. Si nous prouvons que la cavéoline-1 active Rac1, il serait intéressant d'observer par microscopie confocale si ces deux protéines interagissent chez les fibroblastes IMR-90 en SIPS. Nous pourrions de plus essayer de co-immunoprécipiter ces deux protéines après stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A plus long terme, et si ces résultats s'avèrent positifs, l'utilisation des siRNA de la cavéoline-1 permettrait de déterminer si l'inhibition d'activation de Rac1 permet toujours la phosphorylation de p38<sup>MAPK</sup> au cours du temps qui suit le stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des siRNA dirigés contre les transcrits de Rac1 sont utilisés au laboratoire de manière à déterminer plus précisément le rôle de cette protéine Rac1 dans l'établissement de la SIPS. Ces résultats permettront, à plus long terme, d'éclaircir si la voie qui passe par p38<sup>MAPK</sup> est activée par la cavéoline-1 et/ou Rac1.

L'outil « siRNA » était particulièrement adapté dans notre cas puisque même s'il s'agit de transfection transitoire, cela suffit pour nous permettre d'analyser les marqueurs de la sénescence jusqu'à 96 heures après la transfection. Nous nous posons cependant la question de savoir si le fait de bloquer la production de cavéoline-1 ne perturbe pas la membrane plasmique des fibroblastes IMR-90. Ceci peut alors engendrer des changements dans les mécanismes quels qu'ils soient. Il était donc important d'avoir les contrôles respectifs pour chacune des transfections.

D'après les données de la littérature, la cavéoline-1 peut avoir des effets multiples sur les voies de régulation de la prolifération. Ceci est spécifique du type cellulaire étudié (del Pozo *et al.*, 2005).

*In vivo*, l'éclaircissement du rôle de la cavéoline-1 phosphorylée et sa localisation subcellulaire ainsi que l'étude de l'implication de Rac1 dans les cellules tumorales est un sujet intéressant pour les prochaines années de recherche dans ce domaine.



# Bibliographie

## Sixième partie : Bibliographie

- Allen, W. E., D. Zicha, et al. (1998). "A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis." *J Cell Biol* **141**(5): 1147-57.
- Bar-Sagi, D. and A. Hall (2000). "Ras and Rho GTPases: a family reunion." *Cell* **103**(2): 227-38.
- Bayreuther, K., H. P. Rodemann, et al. (1988). "Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5112-6.
- Bender, F., M. Montoya, et al. (2002). "Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1." *Biol Res* **35**(2): 151-67.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-55.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). "Focal adhesions, contractility, and signaling." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 463-518.
- Campisi, J., G. P. Dimri, et al. (1996). "Coming of age in culture." *Exp Gerontol* **31**(1-2): 7-12.
- Chainiaux, F., J. P. Magalhaes, et al. (2002). "UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(11): 1331-9.
- Chant, J. and L. Stowers (1995). "GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more." *Cell* **81**(1): 1-4.
- Chen, Q. and B. N. Ames (1994). "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4130-4.
- Cho, K. A., S. J. Ryu, et al. (2004). "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status." *J Biol Chem* **279**(40): 42270-8.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Coso, O. A., M. Chiariello, et al. (1995). "Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway." *J Biol Chem* **270**(10): 5620-4.
- Cristofalo, V. J., R. G. Allen, et al. (1998). "Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10614-9.
- Cristofalo, V. J., G. S. Gerhard, et al. (1994). "Molecular biology of aging." *Surg Clin North Am* **74**(1): 1-21.
- Cristofalo, V. J. and B. B. Sharf (1973). "Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells." *Exp Cell Res* **76**(2): 419-27.
- Debacq-Chainiaux, F., C. Borlon, et al. (2005). "Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway." *J Cell Sci* **118**(Pt 4): 743-58.
- del Pozo, M. A., N. Balasubramanian, et al. (2005). "Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization." *Nat Cell Biol* **7**(9): 901-8.
- Dierick, J. F., D. E. Kalume, et al. (2002). "Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence." *FEBS Lett* **531**(3): 499-504.



- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-7.
- Dumont, P., M. Burton, et al. (2000). "Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast." *Free Radic Biol Med* **28**(3): 361-73.
- Dumont, P., F. Chainiaux, et al. (2002). "Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide." *Cell Stress Chaperones* **7**(1): 23-35.
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina, et al. (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 457-67.
- Ellis, S. and H. Mellor (2000). "Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases." *Trends Cell Biol* **10**(3): 85-8.
- Engelman, J. A., C. Chu, et al. (1998). "Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain." *FEBS Lett* **428**(3): 205-11.
- Engelman, J. A., R. J. Lee, et al. (1998). "Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer." *J Biol Chem* **273**(32): 20448-55.
- Fahn, H. J., L. S. Wang, et al. (1996). "Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA." *Am J Respir Crit Care Med* **154**(4 Pt 1): 1141-5.
- Filser, N., C. Margue, et al. (1997). "Quantification of wild-type mitochondrial DNA and its 4.8-kb deletion in rat organs." *Biochem Biophys Res Commun* **233**(1): 102-7.
- Frippiat, C., Q. M. Chen, et al. (2001). "Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts." *J Biol Chem* **276**(4): 2531-7.
- Frippiat, C., J. Dewelle, et al. (2002). "Signal transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts." *Free Radic Biol Med* **33**(10): 1334-46.
- Funk, S. E. and E. H. Sage (1991). "The Ca<sup>2+</sup>(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2648-52.
- Galbiati, F., D. Volonte, et al. (1998). "Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade." *Embo J* **17**(22): 6633-48.
- Galbiati, F., D. Volonte, et al. (2001). "Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* **12**(8): 2229-44.
- Gerland, L. M., S. Peyrol, et al. (2003). "Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging." *Exp Gerontol* **38**(8): 887-95.
- Gilson, E., T. Laroche, et al. (1993). "Telomeres and the functional architecture of the nucleus." *Trends Cell Biol* **3**(4): 128-34.
- Gonos, E. S., A. Derventzi, et al. (1998). "Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence." *Exp Cell Res* **240**(1): 66-74.
- Haataja, L., J. Groffen, et al. (1997). "Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family." *J Biol Chem* **272**(33): 20384-8.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-60.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Hill, C. S., J. Wynne, et al. (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." *Cell* **81**(7): 1159-70.



- Horikoshi, T., A. K. Balin, et al. (1986). "Effect of oxygen on the growth of human epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **86**(4): 424-7.
- Hu, W., C. J. Bellone, et al. (1999). "RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity." J Biol Chem **274**(6): 3396-401.
- Joneson, T. and D. Bar-Sagi (1998). "A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production." J Biol Chem **273**(29): 17991-4.
- Ju, H., R. Zou, et al. (1997). "Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity." J Biol Chem **272**(30): 18522-5.
- Koleske, A. J., D. Baltimore, et al. (1995). "Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1381-5.
- Kumazaki, T., M. Kobayashi, et al. (1993). "Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts." Exp Cell Res **205**(2): 396-402.
- Kurz, D. J., S. Decary, et al. (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113** (Pt 20): 3613-22.
- Lee, B. Y., J. A. Han, et al. (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." Aging Cell **5**(2): 187-95.
- Lee, H. C., C. Y. Pang, et al. (1994). "Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing." Biochim Biophys Acta **1226**(1): 37-43.
- Lichtenthaler, H. K. (1998). "The stress concept in plants: an introduction." Ann N Y Acad Sci **851**: 187-98.
- Lindsey, J., N. I. McGill, et al. (1991). "In vivo loss of telomeric repeats with age in humans." Mutat Res **256**(1): 45-8.
- Liu, V. W., C. Zhang, et al. (1998). "Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing." Nucleic Acids Res **26**(5): 1268-75.
- Machesky, L. M. and A. Hall (1996). "Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton." Trends Cell Biol **6**(8): 304-10.
- Medrano, E. E., S. Im, et al. (1995). "Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein." Cancer Res **55**(18): 4047-52.
- Meyne, J., R. L. Ratliff, et al. (1989). "Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(18): 7049-53.
- Michiels, C., O. Toussaint, et al. (1990). "Comparative study of oxygen toxicity in human fibroblasts and endothelial cells." J Cell Physiol **144**(2): 295-302.
- Miki, H., H. Yamaguchi, et al. (2000). "IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling." Nature **408**(6813): 732-5.
- Murano, S., R. Thweatt, et al. (1991). "Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence." Mol Cell Biol **11**(8): 3905-14.
- Nichols, W. W., D. G. Murphy, et al. (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90." Science **196**(4285): 60-3.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." J Cell Biol **144**(6): 1235-44.
- Olson, M. F., A. Ashworth, et al. (1995). "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." Science **269**(5228): 1270-2.



- Olson, M. F., H. F. Paterson, et al. (1998). "Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1." *Nature* **394**(6690): 295-9.
- Pang, C. Y., H. C. Lee, et al. (1994). "Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure." *Arch Biochem Biophys* **312**(2): 534-8.
- Pascal, T., F. Debacq-Chainiaux, et al. (2005). "Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays." *FEBS Lett* **579**(17): 3651-9.
- Perona, R., S. Montaner, et al. (1997). "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins." *Genes Dev* **11**(4): 463-75.
- Quest, A. F., L. Leyton, et al. (2004). "Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease." *Biochem Cell Biol* **82**(1): 129-44.
- Razani, B., Y. Altschuler, et al. (2000). "Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation." *Biochemistry* **39**(45): 13916-24.
- Razani, B., C. S. Rubin, et al. (1999). "Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A." *J Biol Chem* **274**(37): 26353-60.
- Ridley, A. J. (1995). "Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle." *Curr Opin Genet Dev* **5**(1): 24-30.
- Ridley, A. J. (1997). "The GTP-binding protein Rho." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(11): 1225-9.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." *J Cell Sci* **114**(Pt 15): 2713-22.
- Rodemann, H. P. (1989). "Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro." *Differentiation* **42**(1): 37-43.
- Rubin, H. (2002). "The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo." *Nat Biotechnol* **20**(7): 675-81.
- Sager, R., S. Sheng, et al. (1994). "RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 537-46.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 72-6.
- Tang, Z., T. Okamoto, et al. (1997). "Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes." *J Biol Chem* **272**(4): 2437-45.
- Tesco, G., M. Vergelli, et al. (1998). "Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians." *Biochem Biophys Res Commun* **244**(3): 912-6.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (1995). "Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1." *J Biol Chem* **270**(51): 30334-8.
- Toussaint, O., A. Houbion, et al. (1992). "Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture." *Mech Ageing Dev* **65**(1): 65-83.
- Toussaint, O., E. E. Medrano, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes." *Exp Gerontol* **35**(8): 927-45.

- Toussaint, O., Raes, M., Michiels, C., Remacle, J. (1998). "La réponse des cellules au stress: relation entre le processus de vieillissement et la pathologie." Medecine/Science **14**(15): 622-635.
- Toussaint, O., M. Salmon, et al. (2003). Role of subcytotoxic stress in tissue ageing. Topics in Current Genetics. T. Nyström and H. Osiewacz. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **3**.
- van der Loo, B., M. J. Fenton, et al. (1998). "Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels." Exp Cell Res **241**(2): 309-15.
- Volonte, D., F. Galbiati, et al. (2001). "Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress." J Biol Chem **276**(11): 8094-103.
- Volonte, D., K. Zhang, et al. (2002). "Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts." Mol Biol Cell **13**(7): 2502-17.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, et al. (1995). "Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?" Exp Cell Res **220**(1): 186-93.
- Wolowiec, D. (1995). "[Cyclin dependent kinases. From molecular biology to pathology]." Postepy Hig Med Dosw **49**(2): 221-35.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2001). "Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 98-103.
- Yang, J. H., H. C. Lee, et al. (1994). "A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin." Arch Dermatol Res **286**(7): 386-90.
- R. GARRETT et Ch. GRISHAM, *Biochimie*, trad. de la deuxième édition américaine, Paris, 2000, p. 409.

<http://senescence.info/telomeres.html>

<http://www.piercenet.com>



SECRETARIAT BIOLOGIE

F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59

B 5000 NAMUR (Belgique)

Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

**16 JUIN 2006**